

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 532**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/015 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2011 PCT/US2011/035651**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11140525**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2011 E 11778467 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2571497**

54 Título: **Procedimientos y composiciones relacionadas con una vía selectiva del receptor de retinoides**

30 Prioridad:

06.05.2010 US 332124 P

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

01.03.2019

73 Titular/es:

**SANFORD-BURNHAM MEDICAL RESEARCH
INSTITUTE (50.0%)
10901 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US y
XIAMEN UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ZHANG, XIAO-KUN;
SU, YING;
ZHOU, HU;
LIU, WEN y
HUANG, PEI-QIANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 702 532 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

Procedimientos y composiciones relacionadas con una vía selectiva del receptor de retinoides

Campo de la invención

5 La presente invención se encuentra en el campo de los procedimientos y composiciones relacionados con una vía selectiva del receptor de retinoides.

Antecedentes de la invención

10 Los efectos anticancerígenos de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son bien reconocidos (Tegeder, I. y col., FASEB J 15 (12), 2057-2072 (2001); Kashfi, K & Rigas, B, Biochem Pharmacol 70(7), 969-986 (2005)). Los AINE bloquean la producción de eicosanoides mediante la inhibición de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2). Los AINE han recibido una atención significativa como agentes quimiopreventivos prometedores para el

15 Desafortunadamente, los efectos anticancerígenos prometedores de los AINE se han visto ensombrecidos por los efectos secundarios emergentes conjuntos, incluidas las complicaciones cardiovasculares potencialmente mortales y que se sabe que están asociadas con la inhibición de la COX-2. A pesar del vínculo entre la COX-2 y la carcinogénesis, los AINE inducen apoptosis en células cancerosas que no contienen COX-1 ni COX-2, lo que indica que existen otros objetivos intracelulares (Tegeder, I. y col., FASEB J 15 (12), 2057-2072 (2001); Kashfi, K & Rigas, B, Biochem Pharmacol 70(7), 969-986 (2005)).

El documento US 2005/054008 A1 enseña un procedimiento de selección de agentes que modulan la migración del Receptor X Retinoide (RXR).

20 El documento WO 01/12858 A1 enseña un polinucleótido que comprende el elemento de unión a PPAR δ y un procedimiento de preselección de agentes que comprende el mismo.

El documento DE 101 63 426 A1 desvela varios derivados de sulindac.

25 Baldwin G S y col: "Structural requirements for the binding of non-steroidal antiinflammatory drugs to the 78 kDa gastrin binding protein", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 28 JUN 1999, vol. 1428, n.º 1, 28 de junio de 1999 (1999-0628), páginas 68-76, ISSN: 0006-3002 enseña un análogo de alquilo de los compuestos reivindicados instantáneamente, el compuesto Q.

Felts Andrew S y col: "Sulindac derivatives that activate the peroxisome proliferator-activated receptor gamma but lack ciclooxigenase inhibition", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY 28 AUG 2008, vol. 51, n.º 16, 28 de agosto de 2008 (2008-0828), páginas 4911-4919, ISSN: 1520-4804 desvela varios derivados de sulindac.

30 Keller J y col: "Change en apoptosis en patients treated con sulindac", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, FILADELFIA, PA, vol. 114, 15 de Abril de 1998 (1998-04-15), página A620, XP027467433, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1016/S0016-5085(98)82532-8 enseña la eficacia a largo plazo y la toxicidad del sulindac en pacientes con poliposis adenomatosa familiar (PAF).

35 Masunagra R y col: "SULINDAC INHIBITS GROWTH OF RAT COLON CARCINOMA BY INDUCING APOPTOSIS", EUROPEAN SURGICAL RESEARCH, S.KARGER PUBL., BASEL, CH, vol. 32, n.º 5, 1 de septiembre de 2000 (09-01-2000), páginas 305-309, XP001097988, ISSN: 0014-312X, DOI: 10.1159/000008780 enseña la eficacia inhibitoria de sulindac en el desarrollo del cáncer colorrectal.

Sumario de la invención

40 Las realizaciones se refieren a procedimientos y composiciones relacionadas con una vía selectiva del receptor de retinoides. En algunas realizaciones, esta vía está dirigida a manipular un microentorno tumoral. Se describe un procedimiento para inducir la apoptosis en una célula cancerosa. Por ejemplo, se puede proporcionar una composición para evitar o tratar el cáncer, como el compuesto de fórmula (II) descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, se usa una composición que comprende el compuesto K-80003, o un análogo de K-80003, como se describe en el presente documento, para el tratamiento del cáncer.

45 Como se muestra en el presente documento, el sulfuro de sulindac (en lo sucesivo en este documento "sulindac" o "sulindac sulfuro") se une al compuesto RXR α en concentraciones clínicamente relevantes e induce la apoptosis de una manera dependiente de RXR α , identificando el RXR α como un objetivo intracelular de la acción de sulindac. Como también se muestra en el presente documento, sulindac inhibe potentemente la activación de AKT (proteína quinasa B), una quinasa de supervivencia crítica en células cancerosas. Además, se muestra que un RXR α truncado

50 en N-terminal (tRXR α) media la señalización de supervivencia en células cancerosas. Como se muestra en el presente documento, cuando se combina con TNF α , sulindac inhibe una interacción tRXR α /p85 α inducida por TNF α , lo que lleva a la activación de la vía apoptótica mediada por el receptor de la muerte. Además, el análogo de sulindac K-80003, diseñado y sintetizado como se describe en el presente documento, muestra una afinidad incrementada por RXR α sin actividad inhibitoria de COX, y muestra una mayor eficacia para inhibir la activación AKT

dependiente de tRXRa y el crecimiento tumoral de tRXRa en animales.

En el presente documento se describen los ligandos de RXRa derivados de sulindac que se dirigen a una vía apoptótica para la terapia del cáncer. Se describe un procedimiento para inducir la apoptosis en una célula cancerosa, que comprende: la autoregulación de la actividad del factor de necrosis tumoral α (TNF α) en una célula cancerosa, sensibilizando así la célula cancerosa a la supresión del AKT; y poner en contacto la célula cancerosa sensibilizada con un compuesto, en el que se sabe que el compuesto interactúa con el receptor X retinoide α (RXR α), y en el que se sabe que el compuesto suprime la actividad de la proteína quinasa B (AKT) independiente de la vía de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). En un aspecto, la autoregulación de la actividad de TNF α comprende la introducción de TNF α exógeno en la célula cancerosa. En otro aspecto, la autoregulación de la actividad de TNF α comprende la autoregulación de TNF α endógeno en la célula cancerosa. En un aspecto adicional, la célula cancerosa es una célula cancerosa seleccionada de entre el grupo que consiste en una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de hígado y una célula de cáncer de colon. En un aspecto adicional de esta realización, la célula cancerosa es una célula cancerosa seleccionada de entre el grupo que consiste en una célula A549, una célula H460, una célula ZR-75-1, una célula MCF-7, una célula LNCaP, una célula PC3, una célula HepG2, una célula Caco2 y una célula SW480. En un aspecto adicional, el compuesto candidato es un análogo de sulindac, y en el que el análogo muestra al menos una propiedad seleccionada de entre el grupo que consiste en una CI_{50} inferior a la de sulindac cuando se une a RXR α y una CI_{50} mayor que la de sulindac cuando se une a COX-2. En un aspecto adicional, el análogo es un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en K-80001, K-80002, K-80003, K-80004 y K-80005. En un aspecto adicional de esta realización, el análogo es K-80003.

Se describe un procedimiento para seleccionar un compuesto candidato con la capacidad de inducir la apoptosis en una célula cancerosa, que comprende: proporcionar un compuesto candidato a una célula cancerosa; y determinar si el compuesto candidato es capaz de al menos una actividad seleccionada de entre el grupo que consiste en: suprimir la actividad de AKT, activar caspasa-8, activar BAX, inhibir cFLIP y degradar Bid en la célula cancerosa. En un aspecto de esta realización, determinar si el compuesto candidato es capaz de suprimir la actividad de AKT comprende: activar AKT tratando previamente las células cancerosas con ácido todo-trans-retinoico (ATRA) o 9-*cis*-AR; y medir un cambio en el nivel de AKT en la célula cancerosa después de la administración del compuesto candidato.

Se describe un procedimiento para seleccionar un compuesto candidato con la capacidad de inducir la apoptosis en una célula, que comprende: proporcionar un compuesto candidato a una célula; y determinar si el compuesto candidato es capaz de unirse selectivamente a una proteína RXR α truncada (tRXRa). En un aspecto, el compuesto candidato es un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un péptido, una proteína, un ácido nucleico y una molécula pequeña.

Se describe un procedimiento para seleccionar un compuesto candidato con la capacidad de inducir la apoptosis en una célula, que comprende: proporcionar un compuesto candidato a una célula; y determinar si el compuesto candidato es capaz de regular una proteína tRXRa. En un aspecto, el compuesto candidato es un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un péptido, una proteína, un ácido nucleico y una molécula pequeña. En otro aspecto, determinar si el compuesto candidato es capaz de regular una proteína tRXRa comprende determinar si el compuesto candidato es capaz de evitar que tRXRa se una a la proteína p85 α . En un aspecto adicional, determinar si el compuesto candidato es capaz de regular una proteína tRXRa comprende determinar si el compuesto candidato es capaz de evitar que RXR α experimenta una modificación de proteína. En un aspecto adicional de esta realización, la modificación de la proteína comprende la fosforilación. En un aspecto adicional, determinar si el compuesto candidato es capaz de regular una proteína tRXRa comprende determinar si el compuesto candidato es capaz de evitar que la proteína tRXRa migre desde el núcleo al citoplasma.

Se describe un procedimiento para seleccionar un compuesto candidato con la capacidad de inducir la apoptosis en una célula, que comprende: identificar una célula que expresa tRXRa; poner en contacto la célula con un compuesto candidato; y determinar si el compuesto candidato induce la apoptosis de la célula. En un aspecto, el compuesto candidato es un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un péptido, una proteína, un ácido nucleico y una molécula pequeña. En otro aspecto, el compuesto candidato es un compuesto de una biblioteca de moléculas pequeñas. En un aspecto adicional, el compuesto candidato es un compuesto de una peptidoteca. En un aspecto adicional de esta realización, la célula es de la mama o el hígado.

Se describe un procedimiento para seleccionar un compuesto candidato con la capacidad de inhibir el crecimiento de un tumor, que comprende: identificar un tumor que expresa tRXRa; poner en contacto el tumor con un compuesto candidato; y determinar si el compuesto candidato inhibe el crecimiento del tumor. En un aspecto de esta realización, el compuesto candidato es un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un péptido, una proteína, un ácido nucleico y una molécula pequeña. En otro aspecto de esta realización, el compuesto candidato es un compuesto de una biblioteca de moléculas pequeñas. En un aspecto adicional de esta realización, el compuesto candidato es un compuesto de una peptidoteca. En un aspecto adicional de esta realización, el tumor es un tumor de la mama o el hígado.

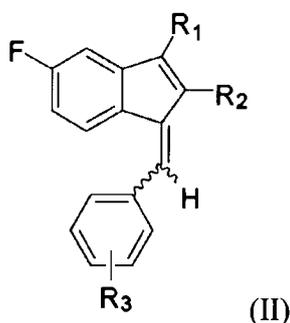
Se describe un procedimiento para evitar el cáncer en un sujeto, que comprende: identificar a un sujeto con un

riesgo elevado de cáncer en relación con la población general; y proporcionar al sujeto un agente que suprima la actividad de AKT, en el que la unión del agente a RXR α en la superficie de una célula en el sujeto da como resultado la supresión de la actividad de AKT. En un aspecto, el procedimiento comprende además administrar TNF α al sujeto antes de administrar el agente, sensibilizando así las células cancerosas en el sujeto a la inhibición de AKT por el agente. En otro aspecto, el agente es un análogo de sulindac. En un aspecto adicional de esta realización, el análogo es un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en K-80001, K-80002, K-80003, K-80004 y K-80005. En un aspecto adicional, el análogo es K-80003.

Se describe un procedimiento para tratar el cáncer en un mamífero, que comprende: identificar a un mamífero que padece cáncer y proporcionar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente que se sabe que suprime la actividad de AKT independiente de la vía de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). En un aspecto, el procedimiento comprende además administrar TNF α al mamífero antes de administrar el agente, sensibilizando así las células cancerosas en el mamífero a la inhibición de AKT por el agente. En otro aspecto, el agente es un análogo de sulindac. En un aspecto adicional de esta realización, el análogo es un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en K-80001, K-80002, K-80003, K-80004 y K-80005. En un aspecto adicional de esta realización, el análogo es K-80003. En un aspecto adicional de esta realización, el mamífero es un ser humano.

Se describe un procedimiento para evitar o tratar el cáncer en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una composición que comprende el compuesto de fórmula (I), en la que A es un arilo o un heteroarilo, y en la que A puede estar opcionalmente sustituido por R₃ y 0, 1, o 2 R₄; en la que B es un arilo o un heteroarilo, y en la que B puede estar opcionalmente sustituido por 0, 1 o 2 R₄; en la que R₁ es (CR₅R₆)_nCOOH; en la que R₂ se selecciona de entre el grupo que consiste en H, un alquilo C₁₋₁₀, un arilalquilo, un cicloalquilo, un cicloalquilalquilo, un haloalquilo, alquilO, alquilS y haloalquilO; en la que R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, un alquilo C₁₋₁₀, un haloalquilo, un halo, CN, un arilo, un heteroarilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, alquilO, alquilS, (CR₄R₆)_nCONR₇R₈, OH, un cicloalquilo, un cicloalquilalquilo, cicloalquilO y un alcoxilalquilo; en la que R₅ y R₆: se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, un alquilo C₁₋₇, OH, un alcoxi, un cicloalquilo; o juntos forman un grupo cicloalquilo o heterociclilo; y en la que n es 0, 1, 2 o 3.

La invención se refiere a un compuesto de fórmula (II) que tiene la estructura:



en la que:

R₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en CH₂COOH y CH₂CH₂COOH;
R₂ es CH₃; y

R₃ se selecciona de entre el grupo que consiste en 4-CH₂CH₃ y 4-CH(CH₃)₂ así como en el compuesto de fórmula (II) como se ha definido anteriormente para su uso en la prevención y tratamiento de cánceres en un sujeto con un riesgo elevado de cáncer en relación con la población general, en el que la unión del compuesto a RXR α en una célula cancerosa en el sujeto da como resultado la supresión de la actividad de AKT independiente de la vía de la ciclooxigenasa (COX).

Se describe un procedimiento para seleccionar un compuesto candidato con la capacidad de inducir la apoptosis en una célula cancerosa de una manera selectiva de RXR α , que comprende: proporcionar un compuesto candidato a una célula cancerosa; y determinar si el compuesto candidato es capaz de unirse a RXR α sin inhibir la actividad COX-2 en la célula cancerosa. En un aspecto, determinar si el compuesto candidato es capaz de unirse a RXR α comprende detectar una sensibilidad alterada de RXR α a la digestión con quimotripsina en la célula cancerosa. En otro aspecto, determinar si el compuesto candidato es capaz de unirse a RXR α comprende detectar un perfil de calorimetría diferencial de barrido (CDB) alterado en la célula cancerosa.

Se describe una composición que comprende un compuesto de fórmula (I), en la que A es un arilo o un heteroarilo, y en la que A puede estar opcionalmente sustituido por R₃ y 0, 1, o 2 R₄; en la que B es un arilo o un heteroarilo, y en la que B puede estar opcionalmente sustituido por 0, 1 o 2 R₄; en la que R₁ es (CR₅R₆)_nCOOH; en la que R₂ se selecciona de entre el grupo que consiste en H, un alquilo C₁₋₁₀, un arilalquilo, un cicloalquilo, un cicloalquilalquilo, un haloalquilo, alquilO, alquilS y haloalquilO; en la que R₃ y R₄ se seleccionan independientemente de entre el grupo

que consiste en H, un alquilo C₁₋₁₀, un haloalquilo, un halo, CN, un arilo, un heteroarilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, alquilO, alquilS, (CR₄R₆)_nCONR₇R₈, OH, un cicloalquilo, un cicloalquilalquilo, cicloalquilO y un alcoxialquilo; en la que R₅ y R₆: se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en H, un alquilo C₁₋₇, OH, un alcoxi, un cicloalquilo; o juntos forman un grupo cicloalquilo o heterociclilo; y en la que n es 0, 1, 2 o 3.

5 De acuerdo con la invención, se proporciona una composición que comprende un compuesto de fórmula (II) como se definió anteriormente, en el que la composición muestra al menos una propiedad seleccionada de entre el grupo que consiste en una Cl₅₀ inferior a la de sulindac cuando se une a RXR α y una Cl₅₀ mayor que la de sulindac cuando se une a COX-2.

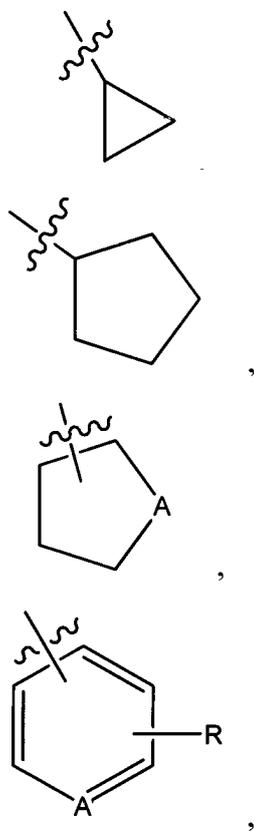
10 De acuerdo con la invención, se proporciona una composición que comprende un compuesto de fórmula (II), en la que R₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en CH₂COOH y CH₂CH₂COOH; en la que R₂ es CH₃; y en la que R₃ se selecciona de entre el grupo que consiste en 4-CH₂CH₃, y 4-CH(CH₃)₂. En un aspecto de esta realización, la composición se selecciona de entre el grupo que consiste en K-8002 y K-8003. En otro aspecto de esta realización, la composición es K-80003.

15 Se describe una composición que comprende un compuesto de fórmula (III), en la que R₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en CH₃, F y Cl; en la que R₂ se selecciona de entre el grupo que consiste en H, CH₃, Cl y F; y en la que R₃ se selecciona de entre el grupo que consiste en CH₃, CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, C(CH₃)₃, CH₂Cl, OCH₃ y SCH₃.

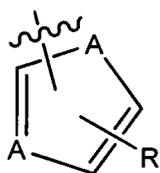
Se describe una composición que comprende un compuesto de fórmula (IV), en la que R₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en CH₃, F y Cl; en la que R₂ se selecciona de entre el grupo que consiste en H, CH₃, Cl y F; y en la que R₃ se selecciona de entre el grupo que consiste en CH₃, CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, C(CH₃)₃, CH₂Cl, OCH₃ y SCH₃.

20 Se describe una composición que comprende un compuesto de fórmula (V), en la que R₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en COOH, CH₂CH₂COOH, CH=CHCOOH, CH₂-tetrazol, CH₂-CH₂-tetrazol, CH₂COOCH₃, CH₃, CH₂CONH₂, CH₂CONHCH₃, CH₂OH, CH₂CH₂OH y CH₂NH₂; en la que R₂ se selecciona de entre el grupo que consiste en H, Cl, CH₂CH₃, OCH₃, NH₂, NHCH₃, CF₃, CH₂NH₂, CH₂OH, CH₂Cl, CH(CH₃)₂ y OCH₂CH₃; en la que R₃ se selecciona de entre el grupo que consiste en H, CH=CH₂, CCH, C(CH₃)₃, CF₃, OH, OCH₃, OCH₂CH₃, NH₂, NHCH₃, CN, NHCOCH₃,

25



30 y



;

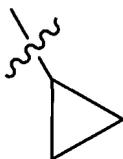
en la que R_4 se selecciona de entre el grupo que consiste en H, Cl, CH_3 , CH_2CH_3 , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, OCH_3 , OCHCH_3 , NH_2 y NHCH_3 .

- 5 Se describe una composición que comprende un compuesto de fórmula (III), en la que R_1 se selecciona de entre el grupo que consiste en CH_3 , F y Cl; R_2 se selecciona de entre el grupo que consiste en H, CH_3 , Cl y F; y en la que R_3 se selecciona de entre el grupo que consiste en CH_3 , CH_2CH_3 , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, CH_2Cl , OCH_3 y SCH_3 .

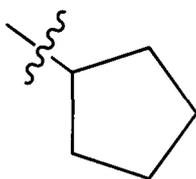
Se describe una composición que comprende un compuesto de fórmula (IV), en la que R_1 se selecciona de entre el grupo que consiste en CH_3 , F y Cl; en la que R_2 se selecciona de entre el grupo que consiste en H, CH_3 , Cl y F; y en la que R_3 se selecciona de entre el grupo que consiste en CH_3 , CH_2CH_3 , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, CH_2Cl , OCH_3 y SCH_3 .

- 10 Se describe una composición que comprende un compuesto de fórmula (V), en la que R_1 se selecciona de entre el grupo que consiste en COOH , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $\text{CH}=\text{CHCOOH}$, CH_2 -tetrazol, CH_2 - CH_2 -tetrazol, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$, CH_3 , CH_2CONH_2 , $\text{CH}_2\text{CONHCH}_3$, CH_2OH , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ y CH_2NH_2 ; en la que R_2 se selecciona de entre el grupo que consiste en H, Cl, CH_2CH_3 , OCH_3 , NH_2 , NHCH_3 , CF_3 , CH_2NH_2 , CH_2OH , CH_2Cl , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ y OCH_2CH_3 ; y en la que R_3 se selecciona de entre el grupo que consiste en H, $\text{CH}=\text{CH}_2$, CCH , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, CF_3 , OH, OCH_3 , OCH_2CH_3 , NH_2 , NHCH_3 , CN, NHCOCH_3 ,

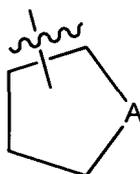
15



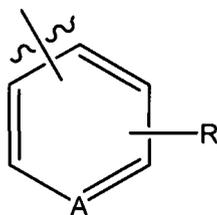
,



,

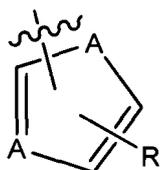


,



,

20 y



;

en la que R_4 se selecciona de entre el grupo que consiste en H, Cl, CH_3 , CH_2CH_3 , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, OCH_3 , OCHCH_3 , NH_2 y NHCH_3 .

5 Se describe una composición que comprende un análogo de sulindac, en la que en análogo muestra al menos una propiedad seleccionada de entre el grupo que consiste en una Cl_{50} inferior a la de sulindac cuando se une a $\text{RXR}\alpha$ y una Cl_{50} mayor que la de sulindac cuando se une a COX-2 .

10 En una realización adicional, se proporciona una composición que comprende un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido 3-(4-fluorofenil)-2-metilacrilico; ácido 3-(4-fluorofenil)-2-metilpropanoico, 6-fluoro-2-metil-2,3-dihidroinden-1-ona; 2-(6-fluoro-2-metil-3*H*-inden-1-il)acetato de etilo; ácido (Z)-2-(3-(4-(metiltio)bencilideno)-6-fluoro-2-metil-3*H*-inden-1-il) acético; ácido (Z)-2-(3-(4-metilbencilideno)-6-fluoro-2-metil-3*H*-inden-1-il) acético; ácido (Z)-2-(3-(4-etilbencilideno)-6-fluoro-2-metil-3*H*-inden-1-il) acético; ácido (Z)-2-(3-(4-iso-propilbencilideno)-6-fluoro-2-metil-3*H*-inden-1-il) acético; 2-(6-fluoro-3*H*-inden-1-il) acetato de etilo; ácido (E)-2-(3-(4-(metiltio)bencilideno)-6-fluoro-3*H*-inden-1-il) acético; espiro(dihidro-2(3*H*)furanona-5-1'(2'*H*) (3'*H*)-6-fluoro-indano; 3-(6-fluoro-3*H*-inden-1-il) propanoato de metilo; (E)-metil 3-(3-(4-(metiltio)bencilideno)-6-fluoro-3*H*-inden-1-il)propanoato; K-80003 análogo n.º 1; K-80003 análogo n.º 2; K-80003 análogo n.º 3; K-80003 análogo n.º 4; K-80003 análogo n.º 5; K-80003 análogo n.º 6; K-80003 análogo n.º 7; K-80003 análogo n.º 8; K-80003 análogo n.º 9; K-80003 análogo n.º 10; K-80003 análogo n.º 11; K-80003 análogo n.º 12; K-80003 análogo n.º 13; K-80003 análogo n.º 14; K-80003 análogo n.º 15; K-80003 análogo n.º 16; K-80003 análogo n.º 17; K-80003 análogo n.º 18; K-80003 análogo n.º 19; K-80003 análogo n.º 20; K-80003 análogo n.º 21; K-80003 análogo n.º 22; K-80003 análogo n.º 23; K-80003 análogo n.º 24; K-80003 análogo n.º 25; K-80003 análogo n.º 26; K-80003 análogo n.º 27; K-80003 análogo n.º 28; K-80003 análogo n.º 29; K-80003 análogo n.º 30; K-80003 análogo n.º 31; K-80003 análogo n.º 32; K-80003 análogo n.º 33; y K-80003 análogo n.º 34.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 muestra la unión de sulindac a $\text{RXR}\alpha$. (a) Unión de sulindac a la proteína $\text{RXR}\alpha$ LBD incubada con [^3H]9-cis-AR o 9-cis-AR sin marcar. b) Unión de sulindac a $\text{RXR}\alpha$ en células HEK293 que expresan de manera estable $\text{RXR}\alpha$, Nur77 o $\text{RAR}\beta$ según se determinó mediante análisis de HPLC. (c) Sensibilidad alterada de $\text{RXR}\alpha$ LBD o $\text{GST-RXR}\alpha$ a la quimotripsina por sulindac. (d) Comparación de los espectros ^{19}F RMN de sulindac en ausencia y presencia de $\text{RXR}\alpha$ LBD o proteína Nur77. Sulindac inhibe la transactivación de homodímeros y heterodímeros de $\text{RXR}\alpha$ según lo determinado por la actividad 2-tk-CAT (TREpal) (Zhang y col., Nature 358, 587-591 (1992a)) (e) o actividad $\beta\text{RARE-tk-CAT}$ (Zhang y col., Nature 355, 441-446 (1992b)) (f).

30 La Figura 2 muestra sulindac induciendo la apoptosis dependiente de $\text{RXR}\alpha$ y la activación de Bax. Efectos apoptóticos de sulindac en células F9 o F9 que carecen de $\text{RXR}\alpha$ ($\text{F9 RXR}\alpha^{-/-}$) según se analizó mediante tinción con DAPI (a), escisión de PARP (b) y fragmentación del ADN (c). $\text{RXR}\alpha$ ARNip inhibe la inducción de apoptosis por sulindac. Las células de cáncer de pulmón H460 transfectadas con control o $\text{RXR}\alpha$ ARNip (d) tratadas con sulindac y analizadas mediante tinción DAPI para la apoptosis (e). (f) La transfección de $\text{RXR}\alpha$ aumenta el efecto apoptótico de sulindac. Las células CV-1 transfectadas con GFP- $\text{RXR}\alpha$ se trataron con sulindac y se analizaron mediante tinción con DAPI. (g) La interrupción de la $\text{RXR}\alpha$ LBP perjudica el efecto apoptótico de sulindac. Las células CV-1 transfectadas con GFP- $\text{RXR}\alpha$ o GFP- $\text{RXR}\alpha/\text{F313S/R316E}$ se trataron con sulindac y se analizaron mediante tinción con DAPI. Apoptosis puntuada en células transfectadas con receptor. Papel de Bax en la inducción de la apoptosis. Células HCT116 o células HCT116 que carecen de Bax ($\text{Bax}^{-/-}$) fueron tratadas con o sin sulindac. Apoptosis determinada por escisión de PARP (h) y tinción con DAPI (i). (j, k) $\text{RXR}\alpha$ ARNip inhibe la activación de Bax inducida por sulindac. Derribar $\text{RXR}\alpha$ en células HCT116 por $\text{RXR}\alpha$ ARNip se puso de manifiesto por inmunotransferencia. Las células HCT116 transfectadas con o sin $\text{RXR}\alpha$ ARNip o ARNip de control se trataron con sulindac, y se analizaron para la oligomerización de Bax (j) y el cambio conformacional de Bax y la orientación mitocondrial mediante inmunotinción/microscopía confocal usando Bax/ $\Delta 21$, Bax/6A7 o anticuerpo anti-Hsp60 (k).

45 La Figura 3 muestra que sulindac inhibe la activación de AKT inducida por $\text{TNF}\alpha$ y la interacción $\text{tRXR}\alpha\text{-p85}\alpha$. (a) Inhibición de la activación de AKT por sulindac. Las células HCT116, SW480, HepG2, ZR75-1, MCF-7, PC3, LNCaP HaCat, y RAW264.7 privadas de alimento durante una noche y tratadas con sulindac se analizaron para determinar la activación de AKT mediante inmunotransferencia. (b) Inhibición de la activación basal de AKT por $\text{RXR}\alpha$ ARNip. Las células HepG2 transfectadas con $\text{RXR}\alpha$ ARNip se trataron con sulindac. La activación de AKT y la expresión de $\text{RXR}\alpha$ se analizaron mediante inmunotransferencia. (c) Inhibición de la activación de AKT inducida por $\text{TNF}\alpha$ por sulindac y $\text{RXR}\alpha$ ARNip. Las células de cáncer de pulmón A549 transfectadas con $\text{RXR}\alpha$ o ARNip de control se trataron previamente con sulindac y se expusieron a $\text{TNF}\alpha$. La activación de AKT y la expresión de $\text{RXR}\alpha$ se analizaron mediante inmunotransferencia. (d) Inhibición sinérgica de la activación de AKT

por TNF α y sulindac. Las células ZR-75-1 y PC3 se trataron previamente con sulindac y se expusieron a TNF α . La activación de AKT se analizó mediante inmunotransferencia. (e) Representación esquemática de anticuerpos anti-RXR α usados en co-inmunoprecipitación y ensayos de inmunotransferencia (arriba). El anticuerpo D20 reconoció los aminoácidos 2-21 en el dominio A/B N-terminal, mientras que el anticuerpo Δ N197 reconoce el dominio E/F C-terminal (a continuación). También se muestra una proteína truncada RXR con aproximadamente 44 kDa. (f) Expresión de tRXR α en diversas líneas celulares de cáncer. Las líneas celulares HCT116, SW480, ZR75-1, MCF-7, PC3, LNCaP, HepG2, HaCat, Caco2, MEF, RAW y BHK tratadas con o sin 9-cis-AR se analizaron mediante inmunotransferencia usando el anticuerpo Δ N197 RXR α .

La Figura 4 muestra el papel de tRXR α en la activación de AKT y el crecimiento celular independiente del anclaje. (a) Producción dependiente de la densidad celular de tRXR α y activación de AKT. Los FER sembrados a diferentes densidades celulares se analizaron para determinar la expresión de RXR α usando el anticuerpo Δ N197 y la activación de AKT por inmunotransferencia. (b) La localización subcelular de RXR α endógeno en los FER se visualizó mediante microscopía confocal después de la inmunotinción usando anti-RXR α (Δ N197). Las células también se tiñeron con DAPI para visualizar el núcleo. (c) La expresión estable de RXR α /1-134 induce la escisión de RXR α y la activación de AKT. Las células HeLa o HeLa que expresan de forma estable RXR α /1-134 se trataron con 9 cis-AR y se analizaron para determinar la activación de AKT y la expresión de RXR α . (d) Crecimiento de células HeLa/RXR α /1-134 y HeLa en agar blando. (e) Sulindac inhibe la supervivencia clonogénica de células HeLa/RXR α /1-134. (f) Producción de tRXR α en tejidos tumorales humanos de mama (5 de 6) o hígado (4 de 6) en comparación con tejidos circundantes y normales del tumor. (g) Localización citoplásmica de RXR α en muestras de tumores hepáticos inmunoteñidas por el anticuerpo Δ N197. T: tejido tumoral; S: tumor que rodea el tejido.

La Figura 5 muestra el papel del RXR α truncado en N-terminal en la activación de PI3K/AKT por TNF α y el crecimiento de células cancerosas. (a) Las células HEK293T se transfectaron con Flag-p85 α y RXR α , RXR α / Δ 80, o RXR α / Δ 100 marcadas con el epítipo Myc, se trataron con TNF α y se analizaron mediante co-inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-Flag. (b) El dominio A/B N-terminal de RXR α interactúa con p85 α . Flag-p85 α se cotransfectó con GFP-RXR α -1-134 y GFP-RXR α -224-462 en células HEK293T, y se analizó su interacción mediante co-inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-Flag. (c) RXR α / Δ 80 es un potente activador de AKT. Activación de AKT de células HEK293T, HeLa, A549 y MCF-7 transfectadas con RXR α / Δ 80 o RXR α / Δ 100 según lo determinado por inmunotransferencia. (d) Co-localización citoplásmica de RXR α / Δ 80 y p85 α . Mic-RXR α / Δ 80 y p85 α se cotransfectaron en líneas celulares PC3 y ZR-75-1, inmunoteñidas con anticuerpos anti-Myc y anti-p85 α , y su localización subcelular puesta de manifiesto por microscopía confocal. (e) Activación de PI3K por inmunoprecipitados de RXR α / Δ 80. Las células A549 transfectadas con Flag-p85 α y Myc-RXR α / Δ 80 se trataron con TNF α y/o sulindac, se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-Myc y se sometieron a un ensayo *in vitro* de PI3K. (f) Expresión estable de RXR α / Δ 80. Las células transfectadas de manera estable con GFP-RXR α / Δ 80 o el vector de control GFP se analizaron mediante inmunotransferencia. (g) RXR α / Δ 80 promueve la supervivencia clonogénica de las células cancerosas. (h, i) RXR α / Δ 80 promueve el crecimiento de células cancerosas en ratones desnudos.

La Figura 6 muestra la activación de una vía apoptótica extrínseca inducida por TNF α por sulindac. (a) Inducción sinérgica de la apoptosis por la combinación de sulindac/TNF α y su inhibición por el ligando RXR α . Las células HepG2 cultivadas en medio con SFB al 1 % se trataron con SR11237, luego con TNF α y/o sulindac, y se analizaron mediante inmunotransferencia. (b) Inhibición de la escisión de caspasa-8 inducida por sulindac/TNF α por RXR α ARNip. Las células HepG2 transfectadas con control o RXR α ARNip se trataron con TNF α y/o sulindac y se analizaron por inmunotransferencia. Inhibición de la escisión de PARP inducida por sulindac/TNF α por el inhibidor de caspasa-8 (c) y ARNip (d). Las células HepG2 transfectadas con control o caspasa-8 ARNip o tratadas previamente con ZIETD-fmk se trataron con TNF α y sulindac y se analizaron mediante inmunotransferencia. (e) Activación de Bax por sulindac y TNF α . Las células HepG2 tratadas con TNF α y/o sulindac fueron inmunoteñidas con el anticuerpo Bax/6A7. (f) Regulación de la escisión de PARP inducida por sulindac/TNF α por AKT. Las células PC3 transfectadas con CA-AKT o DN-AKT se trataron con TNF α y/o sulindac, y se analizaron mediante inmunotransferencia. Activación de caspasa-8 (g) y Bax (h) por sulindac y TNF α . Las células HepG2 transfectadas con CA-AKT se trataron con TNF α y sulindac, y se inmunotifieron con caspasa-8 antiescindida o anticuerpo Bax/6A7. (i) Regulación de la expresión de c-FLIP por TNF α y sulindac. Las células tratadas con TNF α y/o sulindac se analizaron mediante inmunotransferencia.

La Figura 7 muestra el diseño, la síntesis y la evaluación de los análogos de sulindac selectivos para RXR α , (a) Acoplamiento de sulindac sulfuro a la LBP de RXR α en referencia a 9-cis-AR. Las cadenas laterales dentro de 4Å de los ligandos se muestran en gris. (b) Comparación de la orientación y la posición del sulindac sulfuro acoplado a las estructuras cristalinas de 9-cis-AR, DHA y BMS649. (c) Unión a RXR α e inhibición de las actividades COX-1 y COX-2 por los análogos de sulindac. La unión de RXR α se midió mediante ensayos de unión a ligando de competición. (d) Inhibición de la producción de PGE2 por sulindac y análogos. Las células A549 estimuladas con TNF α se trataron con sulindac o análogos. (e) Comparación de los espectros de ¹⁹F RMN de K-80003 en ausencia y presencia de RXR α LBD.

La Figura 8 muestra que K-80003 es un potente inhibidor de la activación de AKT dependiente de RXR α . (a) Inhibición de la activación de AKT por sulindac o K-80003 en presencia de TNF α . (b) Inhibición dependiente de RXR α de la activación de AKT por K-80003. Las células PC3 transfectadas con RXR α o RAR γ ARNip se trataron previamente con K-80003 antes de la exposición a TNF α (pRXR α : RXR α fosforilado). (c) Inhibición de la interacción RXR α / Δ 80 con p85 α por sulindac y K-80003. Las células A549 se transfectaron con Flag-p85 α y Myc-RXR α / Δ 80, se trataron con sulindac o K-80003 antes de la exposición a TNF α , y se analizaron mediante co-

inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Flag. (d) Inducción de la escisión de PARP por sulindac o K-80003 en presencia de TNF α . Las células ZR-75-1 tratadas con TNF α y/o sulindac o K-80003 se analizaron mediante inmunotransferencia. (e) Activación de caspasa-8 por K-80003 en presencia de TNF α . Las células tratadas con TNF α y/o K-80003 se analizaron mediante inmunotransferencia. (f) Inhibición de la supervivencia clonogénica de células RXR α /1-134 y clones estables RXR α / Δ 80 por sulindac y K-80003. (g) Inhibición del crecimiento del tumor RXR α / Δ 80 en animales por sulindac y K-80003.

Las Figuras 9A-C están relacionadas con la Figura 1 y muestran la unión de sulindac a RXR α y su efecto sobre la transactivación de RXR α .

La Figura 10 está relacionada con la Figura 1B y muestra la unión de sulindac a la proteína RXR α según lo determinado por análisis de HPLC.

Las Figuras 11A-D están relacionadas con la Figura 2G y muestran una capacidad alterada del mutante RXR α , RXR/F313S/R316E para mediar el efecto apoptótico de sulindac.

Las Figuras 12A-E están relacionadas con la Figura 3 y muestran que el efecto inhibitorio de sulindac sobre la activación de AKT y la interacción tRXR α -p85 α .

La Figura 13 está relacionada con las Figuras 4B y 5D y muestra la localización citoplásmica de tRXR α usando ensayos de fraccionamiento celular.

La Figura 14 está relacionada con la Figura 4 y muestra la producción de tRXR α endógeno mediante la expresión estable de RXR α /1-134.

Las Figuras 15A-B están relacionadas con la Figura 5E y muestran que tRXR α inmunoprecipita de células de cáncer de pulmón A549.

Las Figuras 16A-D están relacionadas con la Figura 6 y muestran que la apoptosis inducida por sulindac está mediada por una vía apoptótica extrínseca dependiente del receptor de la muerte.

Las Figuras 17A-B están relacionadas con la Figura 6 y muestran la activación sinérgica de caspasa-8 por la combinación de sulindac/TNF α en las líneas celulares de cáncer tanto HepG2 como HCT116, y muestra que la activación de AKT inhibe la apoptosis inducida por la combinación sulindac/TNF α .

Las Figuras 18A-B están relacionadas con la Figura 7 y muestran el diseño de algunos de los análogos de sulindac selectivos para RXR α descritos en el presente documento.

La Figura 19 está relacionada con la Figura 8 y muestra una síntesis del análogo de sulindac K-80003.

La Figura 20 está relacionada con la Figura 8 y muestra que K-80003 es más efectivo que sulindac en la inhibición de la activación de AKT por el ácido todo-trans-retinoico.

Las Figuras 21A-C muestran el efecto inhibitorio del crecimiento de la administración oral de K-80003 en el tumor de mama MCF-7 desarrollado en ratones. (A) Volumen del tumor de mama a lo largo del tiempo en ratones tratados con K-80003 oral o un control. (B) Tejido tumoral de mama de ratones tratados con control. (C) Tejido tumoral de mama de ratones tratados con K-80003.

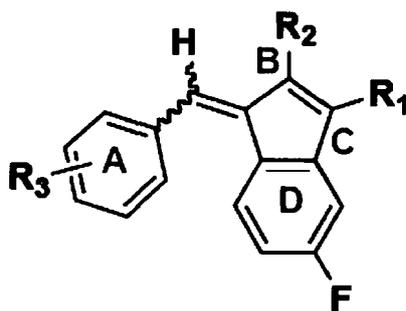
Las Figuras 22A-C muestran la toxicidad y los perfiles de PK para estudios preclínicos de K-80003. (A) Datos de toxicidad. (B) Datos de biodisponibilidad. (C) Datos farmacocinéticos.

Descripción detallada

Diversas realizaciones desveladas en el presente documento están generalmente dirigidas a composiciones y procedimientos relacionados con una vía selectiva del receptor de retinoides. Esta vía puede manipularse como se describe en el presente documento para tratar o reducir el riesgo de desarrollar cáncer.

Como se muestra en el presente documento, tRXR α reside constitutivamente en el citoplasma, interactúa con p85 α , activa AKT y confiere crecimiento de células independiente del anclaje. Estas observaciones ponen de manifiesto una vía de supervivencia mediada por tRXR α en las células cancerosas, lo que proporciona nuevos conocimientos sobre el papel de RXR α y sus ligandos en el cáncer. Dicha activación de la vía de supervivencia PI3K/AKT por procesamiento proteolítico de RXR α es similar a la activación de vías apoptóticas por Bid truncado (tBid) y la activación de la vía Notch por la proteína Notch truncada. Curiosamente, la división de Bid y Notch también altera su localización subcelular, similar al efecto sobre el truncamiento RXR α . El descubrimiento de que RXR α sirve como un objetivo intracelular de la acción de sulindac impulsó el diseño de derivados de sulindac selectivos de RXR α para suprimir la actividad de AKT descrita en el presente documento. Por ejemplo, en el presente documento se proporciona el diseño y la síntesis de un ligando RXR α derivado de sulindac, K-80003, con mayor afinidad por RXR α , y mayor eficacia en la inhibición de AKT, pero que carece de actividad inhibitoria de la COX. Además, como se describe en el presente documento, la autoregulación de TNF α endógeno y/o la introducción de TNF α exógeno puede ser útil para cebar células cancerosas para la capacidad de respuesta.

De acuerdo con la invención, la composición comprende una estructura de núcleo que tiene la fórmula II:



De acuerdo con la invención, R_1 se selecciona de entre el grupo que consiste en CH_2COOH y $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ y R_2 es CH_3 y R_3 se selecciona de entre el grupo que consiste en $4\text{-CH}_2\text{CH}_3$ y $4\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$.

5 Algunas realizaciones de la invención proporcionan además análogos de compuestos, que incluyen análogos y derivados de los compuestos mostrados en el Ejemplo 16, que tienen una estructura de núcleo de fórmula II. Se entiende que se pueden realizar diversas modificaciones a los compuestos descritos en el presente documento para generar análogos usando procedimientos conocidos. Se entiende además que los grupos R en las diversas estructuras de núcleo pueden variar. También se entiende que los análogos de los compuestos desvelados en el presente documento pueden prepararse fácilmente por un experto en la técnica usando procedimientos conocidos de síntesis química y realizando estudios de relación de actividad de estructura (SAR). Además, un experto en la técnica puede determinar fácilmente la actividad de diversos análogos usando los procedimientos descritos en el presente documento.

15 En algunas realizaciones, la CI_{50} del análogo unido a $\text{RXR}\alpha$ es aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de la CI_{50} de sulindac cuando se une a $\text{RXR}\alpha$.

20 En algunas realizaciones, la CI_{50} del análogo unido a COX-1 es aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % mayor que la CI_{50} de sulindac cuando se une a COX-1. En algunas realizaciones, la CI_{50} del análogo unido a COX-1 es aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 250 veces, 500 veces o 1000 veces mayor que la CI_{50} de sulindac cuando se une a COX-1.

25 En algunas realizaciones, la CI_{50} del análogo unido a COX-2 es aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % mayor que la CI_{50} de sulindac cuando se une a COX-2. En algunas realizaciones, la CI_{50} del análogo unido a COX-2 es aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, 250 veces, 500 veces o 1000 veces mayor que la CI_{50} de sulindac cuando se une a COX-2.

Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y ámbito de los diversos términos usados para describir la invención en el presente documento.

30 Como se usa en el presente documento, "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo unido al resto molecular parental a través de un átomo de oxígeno.

Como se usa en el presente documento, "alcoxilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno, dos o tres grupos alcoxi.

35 Como se usa en el presente documento, "alquilo" se refiere a un grupo procedente de un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de uno a diez átomos de carbono.

40 Como se usa en el presente documento, "arilo" se refiere a un grupo fenilo, o a un sistema de anillo fusionado bicíclico en el que uno o ambos anillos es un grupo fenilo. Los sistemas de anillos fusionados bicíclicos consisten en un grupo fenilo fusionado con un anillo carbocíclico aromático o no aromático de cuatro a seis miembros. Los grupos arilo de la presente divulgación pueden unirse al resto molecular parental a través de cualquier átomo de carbono sustituible en el grupo. Ejemplos representativos de grupos arilo incluyen, pero sin limitación, indanilo, indenilo, naftilo, fenilo y tetrahidronaftilo.

Como se usa en el presente documento, "arilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno, dos o tres grupos arilo.

45 Como se usa en el presente documento, "cicloalquilo" se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo monocíclico o bicíclico saturado que tiene de tres a diez átomos de carbono y cero heteroátomos. Ejemplos representativos de grupos cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo y ciclopentilo.

Como se usa en el presente documento, "cicloalquilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno, dos o tres grupos cicloalquilo.

Como se usa en el presente documento, "halo" y "halógeno" se refieren a F, Cl, Br e I.

5 Como se usa en el presente documento, "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno, dos, tres o cuatro átomos de halógeno.

10 Como se usa en el presente documento, "heterociclilo" se refiere a un anillo de cinco, seis o siete miembros que contiene uno, dos o tres heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. El anillo de cinco miembros tiene de cero a dos enlaces dobles y los anillos de seis y siete miembros tienen de cero a tres enlaces dobles. El término "heterociclilo" también incluye grupos bicíclicos en los que el anillo heterociclilo está fusionado con un anillo carbocíclico aromático o no aromático de cuatro a seis miembros u otro grupo heterociclilo monocíclico. Los grupos heterociclilo de la presente divulgación pueden unirse al resto molecular parental a través de un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno en el grupo. Ejemplos de grupos heterociclilo incluyen, pero sin limitación, benzotienilo, furilo, imidazolilo, indolinilo, indolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, morfolinilo, oxazolilo, piperazinilo, piperidinilo, pirazolilo, piridinilo, pirrolidinilo, pirrolopiridinilo, pirrolilo, tiazolilo, tienilo y tiomorfolinilo.

15 Como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente o terapéuticamente aceptable" se refiere a un medio portador que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos y que es mínimamente tóxico para el huésped o el paciente.

20 Como se usa en el presente documento, "estereoisómero" se refiere a un compuesto químico que tiene el mismo peso molecular, composición química y constitución que otro, pero con los átomos agrupados de manera diferente. Es decir, determinados restos químicos idénticos se encuentran en diferentes orientaciones en el espacio y, por lo tanto, cuando son puros, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada. Sin embargo, algunos estereoisómeros puros pueden tener una rotación óptica que es tan leve que es indetectable con la instrumentación actual. Los compuestos descritos en el presente documento pueden tener uno o más átomos de carbono asimétricos y, por lo tanto, incluyen diversos estereoisómeros. Todos los estereoisómeros están incluidos dentro del ámbito de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, "suprimir" la actividad de AKT se refiere a la prevención, mejora, eliminación o cualquier otra reducción de la actividad de AKT. Por ejemplo, suprimir la actividad de AKT puede incluir disminuir los niveles basales de AKT o inhibir la activación de AKT.

30 Como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz" como se aplica a las composiciones desveladas se refiere a la cantidad de composición suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser la prevención, el alivio o la mejora de los signos, síntomas, causas de una enfermedad o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, el resultado puede implicar una disminución y/o reversión del crecimiento de células cancerosas.

35 Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor" se usa de manera intercambiable para denotar "antagonista". Ambos términos definen composiciones que tienen la capacidad de disminuir determinada actividad enzimática o competir con la actividad o función de un sustrato de dicha enzima.

Como se usa en el presente documento, "cáncer" y "canceroso" se refieren a cualquier proliferación maligna de células en un mamífero.

40 Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden usarse para la prevención y el tratamiento de cualquier trastorno maligno conocido por un experto en la técnica, incluyendo cáncer de próstata refractario a hormonas, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, melanoma u otro cáncer de piel, cáncer de pulmón, hepatocarcinoma, leucemia mielógena aguda, cáncer de vejiga, cáncer de cuello de útero, colangiocarcinoma, leucemia mielógena crónica, cáncer colorrectal, sarcoma gástrico, glioma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple, osteosarcoma, cáncer de páncreas, cáncer de estómago o tumores en sitios localizados incluyendo tumores inoperables o en tumores en los que el tratamiento localizado de tumores sería beneficioso, y tumores sólidos).

50 Para aplicaciones *in vivo*, la dosis adecuada de un agente citotóxico dado depende del agente y su formulación, y está dentro de la experiencia habitual de la técnica optimizar la dosificación y la formulación para un paciente dado. Por lo tanto, por ejemplo, dichos agentes pueden formularse para la administración por vía oral, subcutánea, parenteral, submucosa, intravenosa u otras vías adecuadas usando procedimientos convencionales de formulación. La cantidad efectiva y el procedimiento de administración de los compuestos variarán dependiendo del sexo, la edad, el peso y la etapa de la enfermedad del paciente, ya sea que la administración sea terapéutica o profiláctica, y otros factores evidentes para los expertos en la técnica.

55 Los expertos en la técnica obtendrán las dosis y el calendario de administración adecuados para adaptarse a las circunstancias y necesidades específicas del paciente, por ejemplo, dependiendo del peso del sujeto, la gravedad de la afección, la forma de administración y el criterio del médico que prescribe. Típicamente, el intervalo de dosis de la

composición administrada al paciente puede ser de aproximadamente 0,5 a 1000 mg/kg de peso corporal del paciente. La dosis puede ser una o una serie de dos o más en el transcurso de uno o más días, según lo requiera el paciente. En algunas realizaciones, la presente invención usará las mismas dosis, o dosis que están entre aproximadamente 0,1 % y 500 %, más preferentemente entre aproximadamente 25 % y 250 % de la dosis humana establecida para análogos. Las dosis humanas adecuadas también pueden deducirse a partir de la DE_{50} o los valores de DI_{50} , u otros valores adecuados procedentes de estudios *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, según lo calificado por los estudios de toxicidad y estudios de eficacia en animales.

Aunque la dosis exacta se determinará en base fármaco/fármaco, en la mayoría de los casos, se pueden hacer algunas generalizaciones con respecto a la dosis. La pauta posológica diaria para un paciente humano adulto puede ser, por ejemplo, una dosis oral de entre 0,1 mg y 500 mg, preferentemente entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 250 mg, por ejemplo, aproximadamente 150 a aproximadamente 200 mg. En algunas realizaciones, la forma de dosificación oral es aproximadamente 5 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg o 1000 mg. Los compuestos pueden administrarse durante un período de terapia continua, por ejemplo, durante una semana o más, o durante meses o años.

La cantidad de dosis y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del resto activo que sean suficientes para mantener los efectos moduladores, o la concentración mínima efectiva (CME). La CME variará para cada compuesto, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosis para lograr la CME dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Sin embargo, pueden usarse ensayos de HPLC o bioensayos para determinar las concentraciones plasmáticas.

Las composiciones, si se desea, pueden presentarse en un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el principio activo. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El paquete o dispensador también puede ir acompañado de un aviso asociado con el recipiente en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma del fármaco para seres humanos o la administración veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser la etiqueta aprobada por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. para fármacos recetados o el prospecto del producto aprobado. También se pueden preparar composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un portador farmacéutico compatible, colocado en un recipiente adecuado, y marcado para el tratamiento de una afección indicada.

Ejemplos

Ejemplo 1. Unión de sulindac a RXR α

Se realizaron ensayos competitivos de unión al ligando (Fig. 1A) y análisis HPLC de la unión de sulindac a RXR α , Nur77 o RAR β en células HEK293T (Fig. 1B). La proteína RXR α LBD se incubó con [3 H]9-cis-AR en presencia o ausencia de sulindac o 9-cis-AR sin marcar. [3 H]9-cis-AR unido se cuantificó por recuento de centelleo líquido (Fig. 1A).

Se trataron células HEK293T que expresaban de forma estable RXR α fusionadas con una etiqueta TAP C-terminal (Stratagene, La Jolla, CA) con o sin sulindac sulfuro 100 μ M durante 3 h. Después del tratamiento, las células se purificaron y analizaron por HPLC para detectar la presencia de sulindac sulfuro. Se usó una solución convencional de sulindac sulfuro para obtener la curva de calibración. El espectro máximo característico y el tiempo de retención se usaron para la identificación, y se calcularon las áreas máximas en el máximo usado para la cuantificación (Figuras 1B y 10). Sulindac sulfuro unido a RXR α con una Cl_{50} de 80 μ M (Fig. 1A), que se encuentra en el intervalo de concentración que induce la apoptosis. El análisis por HPLC mostró una unión directa de sulindac a RXR α , pero no a otros receptores nucleares como RAR y Nur77 en las células (Figs. 1B y 10).

La proteína RAR γ purificada se incubó con [3 H] AR todo trans en presencia o ausencia de sulindac o AR todo trans sin marcar. El [3 H] AR todo trans se cuantificó por recuento de centelleo líquido. Sulindac no se unió a RAR γ , consecuente con el experimento basado en células que se muestra en la Fig. 1B (Fig. 9A).

Los vectores de expresión del receptor y un gen indicador (TREpal $_2$ -tk-CAT para heterodímeros RXR α /TR α (Fig. 9B), y DR1 tk-CAT para heterodímeros RXR α /PPAR γ (Fig. 9C)) se transfectaron transitoriamente en células CV-1. Las células se trataron con o sin ligandos (ciglitazona, 10 $^{-6}$ M; T $_3$, 10 $^{-7}$ M) en presencia o ausencia de sulindac. Se determinó la actividad CAT. Sulindac inhibió la transactivación de los heterodímeros RXR α /PPAR γ , pero no los heterodímeros RXR/TR (Figs. 9B, C).

También se determinaron la sensibilidad alterada del dominio de unión al ligando RXR α (LBD) a la quimotripsina (μ g/ml) por sulindac (100 μ M) (Fig. 1C) y las exploraciones de calorimetría diferencial de barrido (CDB) que comparan los espectros de 19 F RMN de sulindac (100 μ M) en ausencia y presencia de RXR α LBD 10 μ M o proteína Nur77 (Fig. 1D). La unión a RXR α se confirmó por la sensibilidad alterada de RXR α a la digestión con quimotripsina por sulindac (Fig. 1C) y calorimetría diferencial de barrido (CDB) (Fig. 1D). Además, se midió la inhibición de la transactivación de RXR α activada por SR11237 (10 $^{-6}$ M) por sulindac (Fig. 1F, véase el Ejemplo 2).

Nur77 y/o RXR α se transfectaron transitoriamente en células CV-1. Las células se trataron con o sin SR11237 (10^{-6} M), un agonista selectivo de RXR, en presencia o ausencia de sulindac. (TREpal) 2-tk-CAT (Zhang y col., Nature 358, 587-591 (1992a)) (Fig. 1E) y β RARE-tk-CAT (Zhang y col., Nature 355, 441-446 (1992b)) (Fig. 1F). Se determinó la actividad CAT. La unión de sulindac inhibió la transactivación del homodímero RXR α y del heterodímero en los ensayos informadores (Figs. 1E, F y Fig. 10), demostrando que sulindac es un antagonista transcripcional RXR α .

Ejemplo 2. Efecto letal de sulindac

Para determinar el papel de RXR α en la apoptosis inducida por sulindac, se examinó el efecto letal de sulindac en células F9 y células F9 que carecen de RXR α (F9-RXR α -/-).

Para el análisis de cambio morfológico nuclear, las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 3,7 % y se tiñeron con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (1 mg/ml) para visualizar los núcleos mediante microscopía fluorescente. Los porcentajes de células apoptóticas se determinaron contando al menos 300 células positivas para GFP que tenían fragmentación nuclear y/o condensación de cromatina. Para la determinación de la fragmentación del ADN, se usó ELISA^{PLUS} de detección de muerte celular (Roche Applied Science, Penzberg, Bavaria, Germany).

RXR α ARNip siGENOME SMARpool (M-003443-02), RAR γ ARNip siGENOME SMARpool (M-003439-01) y ARNip de control no específico IX (D-001206-09-05) se adquirieron en DHARMACON (Lafayette, CO). Una parte alícuota de 2,5 μ l de ARNip 20 mM por pocillo se transfectó en células cultivadas en placas de 12 pocillos usando reactivo de oligofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Dos días después de la transfección, las células se recogieron para transferencia de Western.

Las células F9 o F9 que carecen de RXR α (F9 RXR α -/-) se trataron con sulindac (75 μ M) durante 24 h y se analizaron mediante tinción con DAPI (Fig. 2A), escisión de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (Fig. 2B), y la fragmentación del ADN (Fig. 2C). Las células de cáncer de pulmón H460 se transfectaron con ARNip de control o RXR α , se trataron con sulindac (75 μ M) durante 24 h y se analizaron mediante tinción con DAPI para determinar la apoptosis (Figs. 2D y 2E).

Las células CV-1 se transfectaron con GFP-RXR α (Fig. 2F) o GFP-RXR α /F313S/R316E (Fig. 2G), se trataron con sulindac (75 μ M) durante 24 h y se analizaron mediante tinción con DAPI. Las células transfectadas con GFP-RXR α se sometieron a una exhaustiva fragmentación y condensación nuclear (Fig. 2F). La apoptosis se puntuó en células transfectadas con receptores (Figs. 2G y 11). La interrupción del bolsillo de unión al ligando RXR α perjudicó la transactivación de su homodímero (Figs. 11A y 11B). Además, la interrupción del bolsillo de unión al ligando RXR α perjudicó la transactivación de su heterodímero (Figs. 11C, 11D). Los vectores de expresión RXR α (20 ng), RXR α /F313S/R316E (20 ng), β -galactosidasa (100 ng) y Nur77 (100ng) se transfectaron transitoriamente junto con (TREpal) 2-tk-CAT (100 ng) (Figs. 11A, 11B) o β RARE-tk-CAT (100 ng) (Figs. 11C, D) en células CV-1. Las células se trataron con o sin SR11237 (10^{-6} M) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de sulindac (10, 37,5, 75, 150, 300 μ M). Se determinó la actividad CAT.

Sulindac indujo una apoptosis exhaustiva en las células F9, mientras que tuvo poco efecto en las células F9-RXR α -/- (Figs. 2A-2C). El efecto apoptótico de sulindac también se redujo en las células transfectadas con RXR α ARNip (Fig. 2E), mientras que la transfección de RXR α aumentó su efecto letal (Figs. 2F, G). RXR α /F313S/R316E no respondió a la transactivación de homodímeros o heterodímeros inducida por ligandos (Fig. 11) y mostraron respuestas apoptóticas reducidas a sulindac (Fig. 2G). Por lo tanto, se encontró que RXR α estaba involucrado en la apoptosis inducida por sulindac.

Las células HCT116 o las células HCT116 que carecen de Bax (Bax -/-) se trataron con o sin sulindac (75 μ M) durante 24 h. La apoptosis se determinó por escisión de PARP (Fig. 2H) y tinción DAPI (Fig. 2I). Las células HCT116 transfectadas con o sin RXR α ARNip o ARNip de control durante 48 h se trataron con sulindac durante 6 h, y se analizaron para la oligomerización de Bax (Fig. 2J) y el cambio conformacional de Bax y la orientación mitocondrial mediante inmunotinción/microscopía confocal usando Bax/ Δ 21, Bax/6A7 o un anticuerpo anti-Hsp60 (Fig. 2K). Aproximadamente el 60 % de las células mostraron un cambio conformacional BAX.

Sulindac indujo la escisión de PARP (Fig. 2H) y apoptosis (Fig. 2I) en células de cáncer de colon HCT116, pero no en células HCT116 que carecen de Bax (Bax -/-). El hecho de que las células HCT116 sean deficientes de COX-2 demostró que la apoptosis inducida por sulindac puede ser independiente de COX-2. Los ensayos de inmunotransferencia mostraron que Bax se sometió a una oligomerización exhaustiva en las mitocondrias, que fue anulada por el ARNip de RXR α (Fig. 2J). Además, la inmunotinción usando el anticuerpo anti-Bax (Bax/ Δ 21) y un anticuerpo sensible a la conformación Bax/6A7 (Nechushtan y col., Biochem Biophys Res Commun 254, 388-394 (1999)) demostró que sulindac indujo un cambio conformacional de Bax y la orientación mitocondrial se vio afectada por RXR α ARNip (Fig. 2K). Conjuntamente, estos resultados demuestran que RXR α puede actuar como un objetivo intracelular que media el efecto apoptótico de sulindac.

Ejemplo 3. Mutante RXR α

Para abordar el papel de la unión de sulindac a RXR α , se construyó un mutante RXR α (RXR α /F313S/R316E) en el que se alteraron aminoácidos esenciales para mantener la integridad funcional del bolsillo de unión al ligando RXR α (LBP) (Bourguet, W. y col., Mol Cell 5 (2), 289-298 (2000)).

5 Flag-p85 α se construyó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) usando el cebador directo, 5'-ccggaattccatgagtgctgagggtacc-3' y el cebador inverso, 5'-acgctgcgactcatgcctctgctgtcat-3'. El producto de la RCP se digirió con Eco RI y Sal I y se clonó en el vector pCMV-Flag. Los mutantes RXR α se construyeron usando el kit de mutagénesis QUIKCHANGE® (Stratagene, La Jolla, CA) con los siguientes oligonucleótidos como cebadores: RXR α /F313S/R316E, 5'-GGAACGAGCTGCTGATCGCCTCCTCCTCCCACGAGTCCATAGCTGTGAAAGA

10 TGGG (directa - SEQ ID NO:1) y 5'-CCCATCTTTACAGCTATGGACTCGTGGGAGGAGGAGCGATCAGCAGCTCG TTCC (inversa - SEQ ID NO:2); RXR α / Δ 80, 5'-CCGGAATTCGaccacaccacctggc-3' (directa - SEQ ID NO:3); y 5'-CCGCTCGAGctaagtcattgtgctgagc-3' (inversa - SEQ ID NO:4); RXR α / Δ 100, 5'-CCGGAATTCGGtcagcagcagcagcagc-3' (directa - SEQ ID NO:5); y 5'- CCGCTCGAGctaagtcattgtgctgagc-3' (inversa - SEQ ID NO:6). Los productos de la RCP se digirieron con EcoR I y Xho I y se ligaron en el vector pCMV-Myc.

Los vectores de expresión RXR α (20 ng), RXR α /F313S/R316E (20 ng), β -galactosidasa (100 ng) y Nur77 (100 ng) se transfectaron transitoriamente junto con (TREpal) 2-*tk*-CAT (100 ng) (Fig. 11A) o β RARE-*tk*-CAT (100 ng) (Fig. 11B) en células CV-1. Las células se trataron con o sin SR11237 (10⁻⁶ M). Se determinó la actividad CAT.

20 El mutante no respondió a la transactivación inducida por ligando (Fig. 11) y mostró respuestas reducidas a sulindac (Fig. 2G) (véase el Ejemplo 2).

Ejemplo 4. (a) Inhibición de la activación de AKT por sulindac

Se investigó la inhibición de la activación de AKT (una proteína clave responsable de la supervivencia de las células cancerosas) por sulindac.

25 Las células HepG2, SW480, RAW264.7, HCT116, LNCaP, PC3, ZR-75-1 y HaCat se privaron de alimento durante una noche y se trataron con sulindac (100 μ M) durante 1 h y se analizaron para determinar la activación de AKT mediante inmunotransferencia (Fig. 3A). Las células HepG2 también se transfectaron con RXR α ARNip durante 48 h, se trataron con sulindac (100 μ M) durante 1 h y se analizaron para determinar la activación de AKT y la expresión de RXR α mediante inmunotransferencia (Fig. 3B).

30 Las células FER y MCF-7 se privaron de alimento durante una noche, se trataron previamente con sulindac durante 1 h y se estimularon con EGF (100 ng/ml) durante 15 minutos. La activación de AKT se analizó mediante inmunotransferencia (Fig. 12A). Las células MEF y Caco-2 se privaron de alimento durante una noche y se trataron previamente con sulindac durante 30 minutos antes de la exposición a ácido todo-trans-retinoico (ATRA) (10⁻⁷ M) durante 30 minutos y se analizaron para determinar la activación de AKT (Fig. 12B). La activación de AKT en células de cáncer de mama ZR-75-1 transfectadas con RXR α ARNip durante 48 h antes de la exposición a 9-*cis*-AR (10⁻⁷ M) durante 30 minutos también se analizó mediante inmunotransferencia (Fig. 13C). Las células de cáncer de pulmón A549 transfectadas con RXR α o ARNip de control (Fig. 3C) y las células ZR-75-1 y PC3 (Fig. 3D) se trataron previamente con sulindac (100 μ M) durante 1 h antes de la exposición a TNF α (10 ng/ml) durante 30 minutos y se analizaron para determinar la activación de AKT y la expresión de RXR α mediante inmunotransferencia.

40 Se observó una inhibición significativa de la activación basal de AKT por sulindac en diversas líneas celulares de cáncer, incluidas las células de cáncer de colon SW480 y HCT116 negativas para la COX-2 (Fig. 3A), sugiriendo un mecanismo independiente de COX-2. Sulindac no pudo inhibir la activación de AKT por EGF, pero inhibió poderosamente la activación de AKT por ácido retinoico. La transfección de RXR α ARNip redujo significativamente la activación constitutiva de AKT (Fig. 3B), similar al efecto de sulindac. El tratamiento de células con AR todo trans (ATRA) durante 30 minutos indujo fuertemente la activación de AKT, que fue inhibida por sulindac de una manera dependiente de la dosis (Fig. 12B) y por RXR α ARNip (Fig. 12C). Aunque sulindac no pudo inhibir la activación de AKT inducida por el factor de crecimiento epidérmico (Fig. 12A), inhibió potentemente la activación de AKT inducida por el ácido retinoico de manera dependiente de RXR α (Figs. 12B, C). Por lo tanto, sulindac puede interferir con la activación de AKT dependiente de RXR α rápida inducida por AR.

50 Sulindac se examinó para la supresión de la activación de AKT inducida por TNF α . El TNF α activó fuertemente AKT en células de cáncer de pulmón A549, que fue inhibida potentemente por sulindac y RXR α ARNip (Fig. 3C), lo que sugiere que la activación por TNF α de AKT era dependiente de RXR α . Aunque TNF α no activó la AKT en células con alta activación basal de AKT (como las células ZR-75-1 y PC3) y sulindac mostró poco efecto inhibitorio sobre la activación de AKT en estas células, una combinación de sulindac con TNF α de forma sinérgica, y casi completamente, inhibió la activación de AKT (Fig. 3D). Por lo tanto, TNF α es capaz de sensibilizar las células cancerosas a la inhibición de AKT por sulindac, lo que sugiere que TNF α puede estimular a las células cancerosas por su capacidad de respuesta a sulindac, posiblemente al convertir la activación de AKT de un modo independiente de RXR α a dependiente de RXR α .

Las células MCF-7 y de riñón de hámster bebé (BHK) tratadas con 9-cis-AR (10^{-7} M) durante 30 minutos se analizaron para determinar la interacción RXR α -p85 α mediante co-inmunoprecipitación usando D20 o el anticuerpo anti-RXR α D197 (Fig. 12D). Las células de cáncer de pulmón H292 tratadas con 9-cis-AR y/o sulindac (100 μ M) durante 30 minutos se analizaron para determinar la interacción RXR α -p85 α mediante co-inmunoprecipitación usando el anticuerpo Δ N197 (Fig. 12E). Sulindac no pudo inhibir la activación de AKT por EGF, pero inhibió poderosamente la activación de AKT por ácido retinoico. Además, el ácido 9-cis-retinoico promovió la interacción tRXR α con p85 α cuando se usó Δ N197 anti-RXR α , pero no el anticuerpo D20 anti-RXR α .

Ejemplo 5. Interacción de p85 α con tRXR α y RXR α

Se examinó la interacción de RXR α con p85 α . Se usaron anticuerpos anti-RXR α (Santa Cruz Biotechnology, en los análisis de co-inmunoprecipitación (Co-IP) y transferencia de Western (TW). Las células BHK se trataron con ATRA (10^{-7} M) durante 30 minutos. Los lisados se prepararon y se analizaron para la interacción de RXR α -p85 α usando D20 anti-RXR α o el anticuerpo Δ N197 anti-RXR α (Fig. 12D).

Un intento inicial de usar anticuerpos anti-RXR α contra secuencias en el extremo NH₂ de RXR α (D20) mediante ensayos de co-inmunoprecipitación no pudo detectar una interacción clara, aunque el anticuerpo inmunoprecipitó la proteína RXR α de manera efectiva. Sin embargo, cuando se usó otro anticuerpo anti-RXR α contra el dominio de unión al ligando (LBD) del terminal COOH de RXR α (Δ N197), p85 α se co-inmunoprecipitó fácilmente en un TNF α (Fig. 3E) o de manera dependiente del AR (Figs. 12D, E). El anticuerpo anti-RXR α D20 reconoció los aminoácidos 2-21 en el dominio A/B N-terminal, mientras que el anticuerpo anti-RXR α Δ N197 reconoció el dominio E/F C-terminal (Fig. 3E). La co-inmunoprecipitación de p85 α por el anticuerpo Δ N197 anti-RXR α estuvo acompañada de inmunoprecipitación de un RXR α truncado (tRXR α), que no fue detectado por el anticuerpo D20 RXR α , lo que indica su falta de secuencias N-terminales (Fig. 12D). Usando el anticuerpo Δ N197 anti-RXR α , la interacción de p85 α con tRXR α y/o RXR α se mejoró con TNF α y se inhibió con sulindac (Fig. 3E). La interacción de p85 α con tRXR α en presencia de TNF α también fue inhibida por sulindac (Fig. 12E). Estos resultados sugieren que tRXR α se une a p85 α , lo que conduce a la activación de AKT.

Ejemplo 6. Los aminoácidos 80 a 100 de RXR α son críticos para la unión a p85 α

Se examinó la escisión proteolítica intracelular. Las células se trataron con o sin 9-cis-AR (10^{-7} M) durante 30 minutos y los lisados se analizaron mediante inmunotransferencia usando el anticuerpo Δ N197 RXR α (Fig. 3F). Las inmunotransferencias demostraron que RXR α a menudo se escinde en su extremo amino en diferentes contextos celulares y procesos biológicos (Fig. 3F).

Las células de cáncer de pulmón A549 también se trataron con o sin 9-cis-AR durante 30 minutos. Las fracciones nuclear (Nu) y citoplásmica (Cit) se analizaron mediante inmunotransferencia usando anticuerpos anti-RXR α D20 o Δ N197. Para garantizar la pureza de las preparaciones, las fracciones también se sometieron a inmunotransferencia por la presencia de proteínas Hsp60 (específicas del citoplasma) y PARP (específicas del núcleo) (Fig. 13). La localización subcelular de RXR α endógeno en FER se visualizó mediante microscopía confocal después de la inmunotinción usando anti-RXR α (Δ N197). Las células también se tiñeron con DAPI para visualizar el núcleo (Fig. 4B).

RXR α se encontró en la membrana plasmática (Fig. 4A, panel superior) y muestra una estructura punteada en la membrana celular en algunas células (Fig. 4A, panel inferior). La producción de un tRXR de 44 kD en FER también fue regulada por la densidad celular (Fig. 4A). El nivel del tRXR de 44 kDa observado en células cultivadas a baja densidad se redujo cuando las células crecieron a alta densidad, lo que se acompañó con la aparición de un fragmento RXR α más pequeño. Curiosamente, los niveles de la proteína tRXR de 44 kD se correlacionan con la activación de AKT (Fig. 4A), lo que sugiere que la escisión proteolítica dependiente de la densidad celular de RXR α podría ser un mecanismo importante que regule la activación de AKT. Consecuente con la localización citoplásmica de tRXR α (Fig. 13), RXR α se encontró principalmente en el citoplasma cuando las células FER fueron inmunoteñidas por el anticuerpo anti-RXR Δ N197 (Fig. 4B). Por lo tanto, la eliminación de las secuencias finales muy N-terminal de RXR α podría alterar su localización subcelular, lo que confiere su capacidad para interactuar con p85 α . Las observaciones de que p85 α fue co-inmunoprecipitada con tRXR α como se describe en el presente documento sugieren que tRXR α podría unirse a p85 α , lo que conduce a la activación de AKT dependiente de tRXR α .

Se sembraron células FER a diferentes densidades celulares y se prepararon y se analizaron lisados para determinar la activación de AKT mediante inmunotransferencia. Los lisados también se examinaron mediante inmunotransferencia usando el anticuerpo Δ N197 anti-RXR α (Fig. 4A). Los niveles de tRXR α en fibroblastos embrionarios de ratón (FER) se correlacionaron con la activación de AKT de una manera dependiente de la densidad celular (Fig. 4A). Consecuente con la localización citoplásmica de tRXR α , los FER a menudo muestran la localización de la membrana plasmática de RXR α (Fig. 4B).

Para abordar directamente el papel de tRXR α en la interacción p85 α y la activación de AKT, se construyó un mutante RXR α que carece de sus 80 aminoácidos N-terminales (RXR α / Δ 80), que produjo una proteína mutante RXR α con un peso molecular similar al tRXR α endógeno. Cuando el RXR α / Δ 80 marcado con Myc se cotransfectó

con Flag-p85 α en las células, interactuaron fuertemente, lo que se mejoró aún más por el TNF α (Fig. 5A). A diferencia, el mutante RXR α o RXR α de longitud completa que carece de 100 aminoácidos N-terminales (RXR α / Δ 100) no interactuó con Flag-p85 α en las mismas condiciones. Por lo tanto, los aminoácidos 80 a 100 de RXR α son críticos para la unión a p85 α . En apoyo de esto, el dominio A/B N-terminal de RXR α (RXR α /1-134), pero no su LBD (RXR α /224-462), interactuó con p85 α (Fig. 5B). Consecuente con la localización citoplásmica de tRXR α (Fig. 13) RXR α / Δ 80 residía predominantemente en el citoplasma, mostrando una localización de la membrana plasmática difusa y algunas veces punteada (Fig. 5D). La transfección de RXR α / Δ 80, pero no de RXR α / Δ 100, también activó fuertemente el AKT en diversos tipos de células (Fig. 5C).

El inmunocomplejo RXR α / Δ 80 se examinó para determinar la actividad de PI3K *in vitro*. RXR α / Δ 80 y p85 marcados con Myc se cotransfectaron en células A549, y el complejo que contenía Myc-RXR α / Δ 80 se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-Myc y se analizó para determinar la actividad PI3K. Los inmunoprecipitados de Myc-RXR α / Δ 80 específicos preparados a partir de células mostraron una fuerte actividad de PI3K de una manera dependiente de TNF α (Figs. 5E y 15), que se correlaciona bien con su capacidad para interactuar con p85 (Fig. 5A) y la activación de AKT (Fig. 5C). Por lo tanto, se descubrió que la interacción tRXR α /p85 inducida por TNF α activa la señalización PI3K/AKT.

RXR α / Δ 80 se expresó de forma estable en células de cáncer de colon SW480 y HCT116, y los clones estables resultantes, SW480/RXR α / Δ 80 y HCT116/RXR α / Δ 80, mostraron una activación de AKT elevada y una inducción de sus objetivos corriente abajo c-Myc y ciclina D1 (Fig. 5F). Se usaron ensayos de supervivencia clonogénica para evaluar el crecimiento de SW480/RXR α / Δ 80 y HCT116/RXR α / Δ 80. Los clones estables formaron muchas más colonias que las células de control (Fig. 5G). El efecto de RXR α / Δ 80 en el crecimiento de células cancerosas se examinó en animales. Para este fin, se inyectó el mismo número de células que expresaban RXR α /80 o células de control en diferentes flancos de los mismos ratones desnudos y se determinó su crecimiento. Los tumores formados por SW480/RXR α / Δ 80 y HCT116/RXR α / Δ 80 crecieron mucho más rápido que los formados por las células de control en animales (Figs. 5H-I). Conjuntamente, estos resultados demuestran que el RXR α truncado en N-terminal es un potente promotor del crecimiento de células cancerosas *in vivo*.

Ejemplo 7. tRXR α endógeno en la activación de AKT y la transformación celular

La observación de que RXR α de longitud completa no interactuaba con p85 α sugería que el motivo de unión de p85 α en el dominio A/B está enmascarado en RXR α . Por lo tanto, el dominio A/B N-terminal de RXR α podría interactuar con el RXR α de longitud completa (Supp. Fig. 8a), que pone de manifiesto una interacción intramolecular.

Los vectores de expresión GFP-RXR α /1-134 y Myc-RXR α se transfectaron en células HEK293T. La interacción se analizó mediante Co-IP usando un anticuerpo anti-Myc (Supp. Fig. 8a). El RXR α o RXR α /1-134 de longitud completa fusionado con GFP y su extremo N-terminal y el RXR α de longitud completa marcado con el epítipo Myc en su extremo C-terminal se cotransfectaron en células HEK293T. Treinta y seis horas más tarde, los lisados celulares se analizaron por IP y TB con un anticuerpo anti-Myc.

El dominio A/B N-terminal se unió a RXR α (Supp. Fig. 8a). La expresión del fragmento N-terminal de RXR α indujo la escisión de RXR α (Supp. Fig. 8b). La transfección de RXR α /1-134 junto con los niveles mejorados de RXR α de longitud completa de tRXR α (Supp. Fig. 8b), probablemente debido a su interrupción de la interacción intramolecular por la competencia, dio lugar a la exposición de sitios proteolíticos en el extremo N RXR α .

La transfección de la región N-terminal de RXR α , RXR α /1-134, podría mejorar el nivel de tRXR α (Fig. 14). Para estudiar el papel del tRXR α endógeno, RXR α /1-134 se expresó de manera estable en células HeLa, y aumentó significativamente la proteína tRXR α en las células que expresaban RXR α /1-134 de manera estable, lo que estuvo acompañado por una disminución en la proteína RXR α endógena de longitud completa (Fig. 4C). En comparación con las células HeLa parentales, el clon estable HeLa/RXR α /1-134 tenía una activación de AKT más alta (Fig. 4C) y creció rápidamente en agar blando (Fig. 4D), sugiriendo un papel para el tRXR α endógeno en la activación de AKT y en la actividad de transformación celular. En el ensayo de formación de colonias, sulindac inhibió fuertemente las colonias formadas por el clon estable (Fig. 4E). La importancia clínica de tRXR α se ilustró por la presencia de tRXR α en tejidos tumorales de pacientes con cáncer de mama, pero no en los tejidos correspondientes que rodean al tumor y los tejidos normales (Fig. 4F). Se obtuvieron resultados similares en pacientes con cáncer de hígado. El análisis inmunohistoquímico de RXR α en muestras de cáncer de hígado humano puso de manifiesto una fuerte tinción citoplásmica de RXR α en el tejido tumoral, pero no en el tejido que rodea el tumor correspondiente (Fig. 4G). Conjuntamente, estos resultados demuestran que el tRXR α puede contribuir al crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas al activar el AKT, y que las actividades mediadas por tRXR α pueden ser reguladas negativamente por sulindac.

Ejemplo 8. Síntesis de análogos de sulindac

El descubrimiento de que RXR α sirve como un objetivo intracelular de la acción de sulindac proporcionó una oportunidad para identificar los derivados de sulindac selectivos de RXR α para suprimir la actividad de AKT. La unión de sulindac a RXR α y COX-2 (Figs. 7A, 18B) se comparó con los análogos de sulindac de diseño, que favorecen la unión a RXR α , pero desfavorecen la unión a COX. Se compararon estructuras bidimensionales de

sulindac sulfuro e indometacina (Fig. 18A). Se generó una superposición de sulindac e indometacina unida en el sitio activo de COX-2 (Fig. 18B). Sulindac fue modelado intuitivamente para unirse a la COX-2 similar a la indometacina.

Los análogos fueron diseñados y sintetizados (Fig. 19). Los derivados de indanona sustituidos (4) se prepararon usando benzaldehído sustituido (1) como material de partida. En una reacción de Perkin, el derivado (1) se trató con el anhídrido adecuado para dar el derivado (2), que luego se redujo por hidrogenación catalítica para dar el derivado (3). Una acilación de Friedel-Crafts intramolecular catalizada con ácido polifosfórico (PPA) cerró el anillo de 5 miembros para dar el derivado de 1-indanona (4). El tratamiento del derivado (4) con el enolato generado a partir de acetato de etilo y hexametildisilamida de litio (LHMDS), seguido de deshidratación en condiciones ácidas, dio el acetato deseado (5). El indeno-3-acetato (5) producido reaccionó con benzaldehído sustituido (reacción de Claisen-Schmidt) para dar, después de la acidificación, los análogos de sulindac (Z-6). Una etapa para la síntesis de los análogos de sulindac (9) es el acoplamiento reductor mediado por dióxido de samario (SmI_2) del derivado de 1-indanona (4) con acrilato de metilo, que dio espirolactona (7). El tratamiento de una solución metanólica de (7) con una cantidad catalítica de ácido para-toluensulfónico (*p*-TsOH) produjo el producto deshidratado (8), que se sometió a reacción de Claisen-Schmidt y se acidificó para dar análogos de sulindac (9). Es de destacar que, en las reacciones de los compuestos Claisen-Schmidt (5/8), cuando $R_2 = \text{CH}_3$, se formaron predominantemente isómeros *cis* (Z) de los compuestos (6/9); mientras que en el caso de $R_2 = \text{H}$, se formaron predominantemente isómeros *trans* (E) de los compuestos (6/9).

Ejemplo 9. Evaluación de análogos de sulindac

El acoplamiento de sulindac a la LBP de RXR α en referencia a 9-*cis*-AR se evaluó para identificar estrategias para modificaciones estructurales de sulindac para disociar su inhibición de la COX de la actividad de unión de RXR α . El acoplamiento de sulindac a RXR α se muestra en la Fig. 7A. La orientación y posición de sulindac acoplado se comparó con las estructuras cristalinas de 9-*cis*-AR, DHA y BMS649 (Fig. 7B). Sulindac se unió en un modo en el que su grupo carboxilato estaba alineado con el grupo carboxilato encontrado en todos los ligandos RXR α examinados (Fig. 7B), interactuando con Arg316 en la RXR α LBP. La porción de sulfuro de bencilmetilo de sulindac se une a la región hidrófoba del RXR α LBP, superpuesta con el anillo α -ionona de 9-*cis*-AR. En este modo de unión, la interacción de Van der Waals del grupo -SCH₃ en la posición 4 (Fig. 7C) con la proteína RXR α no era óptima y había espacio para la modificación para mejorar la unión a RXR α . La idea de hacer uso de la posición 4 para diseñar análogos selectivos de RXR α fue totalmente respaldada por el hecho de que el profármaco sulindac, el sulfóxido de sulindac y el metabolito sulfona de sulindac no muestran actividad inhibitoria de la COX, mientras que el metabolito de sulindac sulfuro (usado en el presente documento) es un potente inhibidor de la COX (Haanen, 2001). Como se muestra en la Fig. 7A, el grupo carboxilato de sulindac se colocó lejos de Arg316 en comparación con los equivalentes en los ligandos RXR α DHA, BMS649 y 9-*cis*-AR. Reemplazar -CH₂COOH en la posición D con un grupo más voluminoso como -CH₂CH₂COOH ayudaría a colocar el grupo carboxilato más cerca de Arg316 para lograr una buena interacción de carga-carga con RXR α como se observa en 9-*cis*-AR.

Los compuestos candidatos también se examinaron mediante acoplamiento a la estructura cristalina de COX-2 (Fig. 18) para identificar los ligandos que no son COX. Basándose en estas consideraciones, se diseñaron y sintetizaron cinco análogos (Figs. 7C y 19). Su evaluación mostró que todos los análogos conservaban la actividad de unión a RXR α , siendo K-80003 el más potente (aproximadamente 34 veces más alto que sulindac), probablemente debido a su grupo iso-propilo (*i*-Pr) en la posición 4, que ha mejorado la interacción con los restos hidrófobos en Helix7 de RXR α . Significativamente, K-80003 y K-80005 no tuvieron una inhibición detectable de las actividades COX (Fig. 7C) y no pudo inhibir constitutivo y TNF. (Fig. 7D) o la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) inducida por IL-1 β (no se muestra). La unión de K-80003 a RXR α también se confirmó mediante ensayos de unión a 19F RMN (Fig. 7E). Por lo tanto, la unión a RXR α de sulindac puede disociarse de su unión a COX.

Se sembraron células A549 en placas de 24 pocillos en DMEM con suero fetal bovino al 10 %. Después del cultivo durante una noche, las células se estimularon con 10 ng/ml de IL-1 β en medio DMEM sin suero durante 24 h. Después de 10 minutos de tratamiento previo con las concentraciones indicadas de sulindac o análogo, las células se trataron conjuntamente con ácido araquidónico 10 μM y sulindac o su análogo durante 30 minutos a 37 °C. El medio se recogió y ensayó inmediatamente. La producción de PGE₂ se midió con Prostaglandin E₂ EIA Kit-Monoclonal de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). La producción de PGE₂ (%) se expresa como la relación de PGE₂ producida en presencia de compuesto a la de vehículo solo.

La evaluación de los análogos mostró que todos ellos conservaron la actividad de unión a RXR α , siendo K-80003 el más potente (aproximadamente 34 veces más alto que sulindac) (Fig. 7C), probablemente debido al grupo iso-propilo (*i*-Pr) en la posición 4, que mostró una mejor interacción con los restos hidrófobos en Helix7 de RXR α . K-80003 y K-80005 no tuvieron una inhibición detectable de las actividades COX (Fig. 7C) y no inhibió constitutivo o TNF α - (Fig. 7D) o producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) inducida por IL-1 β (no mostrada). Los espectros de ¹⁹F RMN de K-80003 (100 μM) se compararon en ausencia y presencia de RXR α LBD 10 μM (Fig. 7E).

Las células Caco-2 y MEF se trataron con la concentración indicada de sulindac o K-80003 durante 30 minutos, luego se estimularon con AR todo *trans* (10⁻⁷ M) durante 15 minutos. La activación de AKT se analizó mediante inmunotransferencia. Las células PC3 transfectadas con RXR α o RAR γ ARNip se trataron previamente con K-80003 (50 μM) durante 1 h antes de exponerlas a TNF α (10 ng/ml) durante 30 minutos (pRXR α : RXR α fosforilado). Las células A549 se transfectaron con Flag-p85 α y Myc-RXR α / Δ 80, se trataron con sulindac (50 μM) o K-80003 (50 μM)

durante 1 h, se expusieron a TNF α durante 30 minutos y se analizaron mediante co-inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Flag. K-80003 (50 μ M) fue mucho más eficaz que sulindac (50 μ M) para inhibir la activación de AKT inducida por ATRA (Fig. 20), y la activación de AKT inducida por TNF α (Fig. 8A), la formación de colonias de un clon estable HeLa/RXR α /1-134 (Fig. 8B), y la interacción de p85 α con RXR α / Δ 80 (Fig. 8C). Reducir la expresión de RXR α por ARNip perjudicó en gran medida el efecto inhibitorio de K-80003 sobre la activación de AKT en células PC3. En comparación, una reducción de la expresión de RAR α por RAR α ARNip no mostró dicho efecto. Por lo tanto, la inhibición de la activación de AKT por K-80003 también fue dependiente de la expresión de RXR α (Fig. 8B).

Los ensayos de co-inmunoprecipitación demostraron que la interacción de RXR α / Δ 80 con p85 α ya sea en ausencia o presencia de TNF α fue inhibido potentemente por K-80003 en comparación con el efecto de sulindac (Fig. 8C).

10 Las células ZR-75-1 se trataron con TNF α y/o sulindac (75 μ M) o K-80003 (50 μ M) durante 6 h y se analizaron mediante inmunotransferencia. K-80003 también fue más efectivo que sulindac para inducir la escisión de PARP cuando se usa junto con TNF α en células ZR-75-1 (Fig. 8D). Similar a sulindac, K-80003 en combinación con TNF α indujo sinérgicamente la escisión de PARP y la activación de caspasa-8 en células HepG2 y PC3 (Fig. 8E).

15 En los ensayos de supervivencia clonogénicos, la formación de colonias de clones estables HeLa/RXR α /1-134 y clones estables RXR α / Δ 80 fue casi completamente suprimida por K-80003, poniendo de manifiesto su capacidad para inhibir el crecimiento celular (Fig. 8F). El efecto inhibitorio de K-80003 sobre la activación de AKT fue anulado por RXR α , pero no RAR γ ARNip (Fig. 8F), sugiriendo un papel de RXR α en la mediación de sus efectos.

20 Los ratones (n = 6) se trataron por vía intraperitoneal con aceite de maíz, sulindac (60 mg/kg) o K-80003 (60 mg/kg) durante dos semanas. Los tumores fueron extirpados y medidos. Significativamente, K-80003 exhibió un efecto inhibitorio mucho más potente que sulindac en el crecimiento del tumor RXR α / Δ 80 en animales (Fig. 8G). Conjuntamente, el análogo de sulindac selectivo a RXR α K-80003 es un potente inhibidor de la señalización de PI3K/AKT mediada por RXR α y el crecimiento de las células cancerosas.

Ejemplo 10. Detección de análogos de sulindac en un mamífero

25 Se selecciona un panel de análogos de sulindac para detectar un compuesto con la capacidad de inducir la apoptosis en las células. Cada compuesto candidato se introduce en un ratón y se analiza para determinar si es capaz de suprimir la actividad de AKT, activar caspasa-8, activar BAX, inhibir el cFLIP y degradar Bid en las células. Los compuestos identificados durante la selección se pueden usar para ensayos de selección adicionales o procedimientos de tratamiento como se desvela en el presente documento.

Ejemplo 11. Tratamiento del cáncer en un paciente humano

30 Se identifica a un paciente humano que necesita tratamiento para el cáncer y se le administra un compuesto que se sabe que interactúa con RXR α y funciona independientemente de la vía COX-2. Se monitoriza al paciente para determinar la estabilización o mejoría del cáncer resultante de la administración del compuesto. Se observa un efecto antitumorígeno en el paciente después de la administración del compuesto.

Ejemplo 12. Prevención del cáncer en un paciente humano

35 Se identifica a un paciente humano con un riesgo elevado de desarrollar cáncer en relación con la población general y se le indica que tome un comprimido de 150 mg que contiene el principio activo K-80003 dos veces al día. El paciente es monitoreado y no desarrolla cáncer después de la administración del compuesto.

Ejemplo 13. Activación de sulindac de la vía apoptótica extrínseca inducida por TNF α

40 Las células HepG2 cultivadas en medio con SFB al 1 % se trataron con SR11237 (1 μ M) durante 1 h, luego TNF(10 ng/ml) y/o sulindac (75 μ M) durante 4 h, y se analizó mediante inmunotransferencia. Las células HepG2 transfectadas con control o RXR α ARNip se trataron con TNF α y/o sulindac y se analizaron por inmunotransferencia.

45 El tratamiento de las células del cáncer de hígado HepG2 (Fig. 6A) y otras líneas celulares de cáncer (Figs. 16 y 17) con sulindac y TNF α indujo eficazmente la escisión de PARP y la activación de caspasa-8 (indicada por productos de caspasa-8 escindidos, p43/p41), mientras que el tratamiento de estas células con sulindac o TNF α solo tuvo poco efecto. El efecto apoptótico de la combinación sulindac/TNF α fue parcialmente suprimido por el ligando selectivo a RXR α SR11237 (Fig. 6A) o la transfección de RXR α ARNip (Fig. 6B), nuevamente demostrando un papel para RXR α .

50 Las células HepG2 transfectadas con control o caspasa-8 ARNip o pretratadas con ZIETD-fmk (40 μ M) durante 1 h se trataron con TNF α y sulindac y se analizaron por inmunotransferencia. una supresión completa de la escisión de PARP inducida por sulindac/TNF α (Figs. 6C y 16B-C). Se obtuvieron resultados similares cuando las células se transfectaron con ARNip de caspasa-8 (Figs. 6D y 16D). Por lo tanto, la apoptosis inducida por sulindac/TNF α está mediada por la vía apoptótica extrínseca.

Activación de Bax por sulindac y TNF α . Las células HepG2 tratadas con TNF α y/o sulindac fueron inmunoteñidas con el anticuerpo Bax/6A7. Aproximadamente el 15 % de las células tratadas con sulindac, si bien aproximadamente

- el 60 % de las células tratadas con sulindac/TNF α mostraron tinción con Bax. También se examinó la activación potencial de sulindac de la vía apoptótica extrínseca que dio como resultado la activación de Bax. Las células HepG2 tratadas con TNF α o sulindac solas o juntas se examinaron para determinar la activación de Bax mediante inmunotinción usando un anticuerpo Bax/6A7 sensible a la conformación. Se observó una tinción significativa de Bax solo cuando las células se trataron con TNF α y sulindac (Fig. 6E). La comunicación cruzada entre las vías apoptóticas extrínsecas e intrínsecas puede vincularse mediante la escisión y activación de Bid (Li y col., Cell 94 (4), 491-501 (1998)). De hecho, Bid se degradó significativamente en células tratadas con TNF α y sulindac (Fig. 6A), sugiriendo que la activación de Bax inducida por sulindac/TNF α podría estar mediada a través de la activación de Bid.
- Las células PC3 transfectadas con CA-AKT o DN-AKT se trataron con TNF α y/o sulindac, y se analizaron mediante inmunotransferencia (Fig. 6F). Activación de la caspasa-8 (Fig. 6G) y Bax (Fig. 6H) por sulindac y TNF α . Las células HepG2 transfectadas con CA-AKT se trataron con TNF α y sulindac, y se inmunotifñieron con caspasa-8 antiséncida o anticuerpo Bax/6A7. Aproximadamente el 80 % de las células no transfectadas y el 15 % de células transfectadas con CA-AKT mostraron tinción con caspasa-8. Aproximadamente el 60 % de las células no transfectadas y aproximadamente el 13 % de las células transfectadas con CA-AKT mostraron tinción con Bax. La escisión de PARP inducida por sulindac/TNF α se inhibió mediante la transfección de AKT constitutivo-activo (CA-AKT) pero se mejoró mediante la transfección de AKT dominante-negativo (DN-AKT) (Fig. 6F). Sistemáticamente, la inducción de apoptosis (Fig. 17B) y la activación de caspasa-8 (Fig. 6G) y Bax (Fig. 6H) por combinación de sulindac/TNF α fue inhibida por CA-AKT.
- Las células tratadas con TNF α y/o sulindac durante 6 h se analizaron mediante inmunotransferencia (Fig. 6I). Se examinó la expresión de c-FLIP, un gen diana corriente abajo de la señalización de AKT, que actúa como un potente inhibidor de la vía apoptótica extrínseca mediante la inhibición de la activación de la caspasa-8. El tratamiento de las células HepG2, A549 y SW480 con TNF α dio como resultado una fuerte inducción tanto de la forma corta (c-FLIPS) como de la forma larga (c-FLIPL) de c-FLIP, que fue inhibida por sulindac (Fig. 6I). Por lo tanto, sulindac puede inducir apoptosis al suprimir el efecto inductor de TNF α en la expresión de c-FLIP.

Ejemplo 14. Inhibición del crecimiento en tumores de mama con K-80003

- Se investigó el efecto inhibitor del crecimiento de la administración oral de K-80003 en el tejido tumoral mamario MCF-7 crecido en ratones. K-80003 se disolvió en NaHCO₃ (pH 8,0). A los ratones con tejido tumoral mamario MCF-7 se les administró 15mg/kg de K-80003, 30 mg/kg de K-80003, 60 mg/kg de K-80003, o un control en un volumen total de 100 μ l por sonda una vez al día. El volumen del tumor medido durante 20 días indicó que los ratones tratados con K-80003 oral mostraron una disminución dependiente de la dosis en el volumen del tumor en comparación con los ratones tratados con control (Fig. 21A).

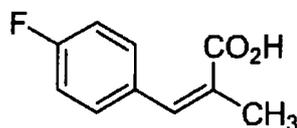
Ejemplo 15. Estudios preclínicos de K-80003

- Se realizaron estudios preclínicos de K-80003, incluida la investigación de toxicidad, biodisponibilidad y farmacocinética. K-80003 mostró muy baja toxicidad (Fig 22A), aumento de la biodisponibilidad en la formulación oral en comparación con la intravenosa (Fig. 22B), y perfiles de PK deseables (Fig. 22C).

Ejemplo 16. Producción de análogos

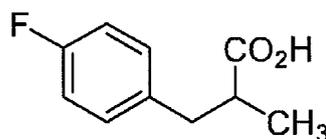
(referencial en la medida en que se preparan compuestos que no se encuentran dentro de la fórmula (II) definida anteriormente)

40 **Ácido 3-(4-fluorofenil)-2-metilacrílico (2a)**



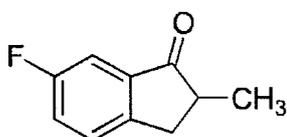
- Se añadió anhídrido propiónico (31,0 ml, 242 mmol) a carbonato de potasio (18,2 g, 132 mmol) a 0 °C. Después de agitar durante 5 minutos para mezclar, se añadió p-fluorobenzaldehído (**1a**) (13,0 ml, 120 mmol). La mezcla se calentó a 160 °C durante 12 h. Después de enfriar con un baño de hielo, a la mezcla de reacción se añadió agua. El precipitado amarillo resultante se filtró y se lavó con EtOAc para producir el ácido bruto **2a**, que se usó en la siguiente etapa tal como estaba. Se obtuvo una muestra analítica del conocido ácido acrílico **2a** (40) por recristalización en MeOH. **2a**: cristales de color amarillo pálido. Pf 155-158 °C (MeOH). IR (KBr): $\nu_{\text{máx}}$, = 3429, 3076, 2972, 1665, 1596, 1508, 1425, 1313, 1298, 1224 cm^{-1} ; ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ : 2,09 (s, 3H, CCH₃), 7,22-7,11 (m, 2H, Ph-H), 7,52-7,43 (m, 1H, Ph-H), 7,69 (s, 1H, CH=CCH₃) ppm; ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD) δ : 12,7, 114,8, 115,1, 131,4, 131,5, 132,1, 132,2, 137,5, 161,3, 163,75, 170,4 ppm; EM (ESI) m/z 179 ((M-H)⁺).

Ácido 3-(4-fluorofenil)-2-metilpropanoico (3a)



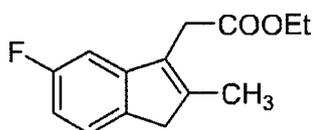
Una mezcla del ácido acrílico bruto **2a** (14,3 g, 79,4 mmol) y 10 % de Pd/C (1,35 g) en metanol (190 ml) se hidrogenó bajo 20 atm de hidrógeno durante 10 h. El catalizador se separó por filtración y el filtrado se concentró para dar **3a** bruto, que se usó en la siguiente etapa tal como estaba. Se obtuvo una muestra analítica del compuesto **3a** (40) mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre gel de sílice (acetato de etilo: PE, 1:2). **3a**: aceite incoloro. IR (película): ν_{\max} = 3406, 2972, 2933, 1701, 1560, 1509, 1460, 1406, 1223 cm^{-1} ; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,17 (d, J = 6,82 Hz, 3H, CHCH_3), 2,77-2,61 (m, 2H, CH_2CH), 3,02 (dd, J = 13,18, 6,35 Hz, 1H, CH_2CH), 7,00-6,93 (m, 2H, *Ph-H*), 7,16-7,11 (m, 2H, *Ph-H*) ppm; ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 16,4, 38,4, 41,4, 115,1, 115,1, 130,3, 130,4, 134,5, 134,6, 160,4, 162,8, 182,6 ppm; EM (IEN) m/z 181 (M-H^+).

10 6-fluoro-2-metil-2,3-dihidroinden-1-ona (4a)



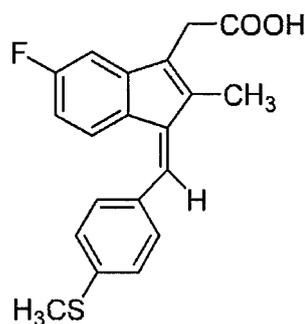
Una mezcla del derivado de ácido propanoico bruto **3a** (3,20 g) y ácido polifosfórico (47,0 g) se calentó a 80 °C durante 4 horas. La mezcla resultante se vertió en agua enfriada con hielo y se extrajo con EtOAc. Los extractos combinados se lavaron con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 para eliminar los ácidos de partida, y después se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (acetato de etilo: PE, 1:30) para dar el compuesto **4a** (40) en forma de un aceite de color amarillo pálido (1,44 g, 50 %). La capa NaHCO_3 se acidificó con HCl conc., extraído con EtOAc (3x30 ml). Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar el material de partida recuperado **3a** (34 %). Los datos para **4a**: IR (película) ν_{\max} = 3064, 2968, 2932, 2873, 1716, 1611, 1509, 1486, 1444, 1264, 1158 cm^{-1} ; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,32 (d, J = 7,37 Hz, 3H, CHCH_3), 2,82-2,65 (m, 2H, CH_2CH), 3,37 (dd, J = 16,71, 7,55 Hz, 1H, CH_2CH), 7,33-7,26 (m, 1H, *Ph-H*), 7,44-7,36 (m, 2H, *Ph-H*) ppm; ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 16,2, 34,4, 42,9, 76,3, 109,7, 109,9, 122,2, 122,5, 127,8, 127,9, 138,1, 148,8, 149,6, 161,1, 163,6, 208,5 ppm; EM (IEN) m/z 187 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

2-(6-fluoro-2-metil-3H-inden-1-il)acetato de etilo (5a)



A una solución de HMDS (15,0 ml, 56,9 mmol) en THF anhidro (38,0 ml) a 0 °C se añadió gota a gota *n*-BuLi (solución 2,5 M en *n*-hexano, 17,0 ml, 42,8 mmol). Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la mezcla se enfrió a -78 °C y se añadió EtOAc (4,20 ml, 42,8 mmol). La mezcla se agitó a -78 °C durante otros 30 minutos. A la mezcla resultante se añadió gota a gota una solución de indenona **4a** en THF anhidro (40 ml). La mezcla se agitó a -78 °C durante otras 4 h y luego se enfrió con una solución acuosa saturada de NH_4Cl . La mezcla se extrajo con EtOAc (3x20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Al residuo se añadió $\text{HOAc}/\text{H}_2\text{SO}_4$ (10/1, 55 ml). Después de agitar durante 5 horas a t.a., la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (3x15 ml). Los extractos combinados se lavaron sucesivamente con agua, NaHCO_3 saturado, y salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (acetato de etilo: PE, 1:30) para dar el compuesto **5a** (40) en forma de un aceite incoloro (3,26 g, 70 %). IR (película) ν_{\max} = 2981, 2911, 1736, 1614, 1590, 1473, 1368, 1329, 1308, 1256, 1154, 1034 cm^{-1} ; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,25 (t, J = 7,13 Hz, 3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 2,12 (s, 3H, CCH_3), 3,29 (s, 2H, PhCH_2C), 3,48 (s, 2H, PhCCH_2), 4,14 (c, J = 7,13 Hz, 2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 6,79 (ddd, J = 9,62, 8,12, 2,41 Hz, 1H, *Ph-H*), 6,96 (dd, J = 9,33, 2,40 Hz, 1H, *Ph-H*), 7,25 (dd, J = 8,17, 4,93 Hz, 1H, *Ph-H*) ppm; ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 14,1, 14,3, 31,5, 42,1, 60,9, 105,6, 105,9, 110,2, 110,4, 123,6, 123,7, 129,6, 129,6, 137,2, 137,2, 144,6, 147,8, 147,9, 161,2, 163,6, 170,7 ppm; EM (IEN) m/z 257 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

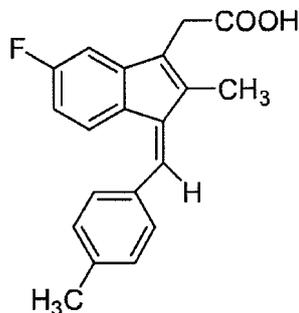
Ácido (Z)-2-(3-(4-(metiltio)encilideno)-6-fluoro-2-metil-3H-inden-1-il)acético (sulindac sulfuro) (6a)



A una solución de indeno **5a** (650 mg, 3 mmol) en MeOH (4,6 ml) se añadió NaOMe 2 N (4,6 ml, 9 mmol) a temperatura ambiente para obtener una mezcla naranja. Después de agitar durante 20 minutos, a la mezcla se le añadió p-(metiltio)benzaldehído (0,8 ml, 7,5 mmol). La mezcla resultante se calentó a reflujo a 80 °C durante 3,5 h. Después de la concentración a presión reducida, el residuo se vertió en una solución de HCl 1 N. Después de agitar durante otras 10 h a temperatura ambiente, la mezcla se extrajo con EtOAc (3x15 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (acetato de etilo: PE, 1:2,5) para dar predominantemente el isómero *cis* (Z) **6a** (sulindac sulfuro) (40) en forma de un sólido de color amarillo (868 mg, 85 %). El isómero *trans* (E) se obtuvo en aproximadamente 2 %. Pf 182-185 °C (EtOAc) (lit. (40) Pf 180-184 °C). IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ = 3445, 3012, 2914, 2850, 1702, 1602, 1589, 1465, 1410, 1320, 1240, 1171, 1085 cm⁻¹; ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2,15 (s, 3H, C=CCH₃), 2,54 (s, 3H, SCH₃), 3,57 (s, 2H, CH₂COO), 6,77-6,71 (m, 1H, vinilo H), 7,01 (dd, *J* = 9,31, 2,25 Hz, 1H, vinilo H), 7,25-7,46 (m, 5H, Ph-H), 12,40 (s, 1H, COOH) ppm; ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ : 10,7, 14,7, 31,5, 106,1, 106,4, 110,6, 110,8, 123,4, 123,5, 125,8, 130,0, 130,3, 131,0, 132,1, 132,6, 138,5, 139,5, 139,5, 139,5, 147,2, 147,3, 161,5, 161,6, 172,1 ppm; EM (IEN) *m/z* 331 (M+Na⁺).

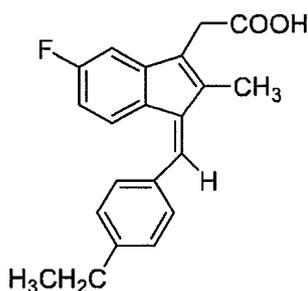
Después del procedimiento descrito para el sulindac sulfuro (**6a**) y la condensación del indeno **5a** con un aldehído aromático adecuado, se sintetizaron los compuestos K-80001 a K-80003, respectivamente.

Ácido (Z)-2-(3-(4-metilbenzilideno)-6-fluoro-2-metil-3H-inden-1-il)acético (**6b**) (K-80001)



Sólido de color amarillo. Pf 155-158 °C. Rendimiento: 87 %. IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ = 3426, 3022, 2959, 2915, 1733, 1717, 1655, 1599, 1512, 1470, 1408, 1381, 1214, 1172 cm⁻¹; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 2,19 (s, 3H, C=CCH₃), 2,41 (s, 3H, Ph-CH₃), 3,58 (s, 2H, CH₂CO₂H), 6,59-6,53 (m, 1H, vinilo H), 6,87 (dd, *J* = 8,98, 2,40 Hz, 1H, vinilo H), 7,44-7,16 (m, 6H, Ph-H) ppm; ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ : 10,61, 21,43, 29,73, 31,44, 105,54, 105,77, 110,48, 110,71, 123,73, 123,83, 129,21, 129,32, 129,78, 129,80, 129,84, 129,87, 131,00, 131,02, 133,48, 138,29, 138,95, 139,76, 146,13, 146,22, 161,84, 164,29, 176,68 ppm; EM (IEN) *m/z* 363 (M+Na⁺). Anal. calcd para C₂₀H₁₇FO₂: C, 77,90; H, 5,56. Hallado: C, 77,88; H, 5,99.

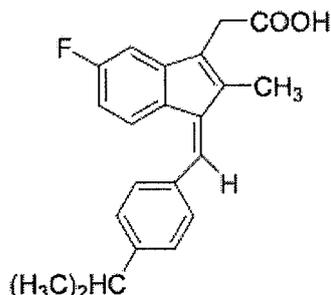
Ácido (Z)-2-(3-(4-etilbenzilideno)-6-fluoro-2-metil-3H-inden-1-il)acético (**6c**) (K-80002)



Sólido de color amarillo. Pf 159-162 °C. Rendimiento: 83 %. IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ = 3082, 3024, 2965, 2923, 1705, 1604,

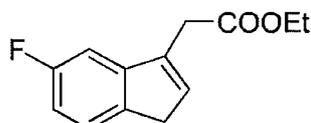
1473, 1465, 1413, 1312, 1229, 1168 cm^{-1} ; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,29 (t, $J = 7.61$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 2,20 (s, 3H, $\text{C}=\text{CCH}_3$), 2,71 (c, $J = 7.60$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 3,59 (s, 2H, CH_2COO), 6,60-6,54 (m, 1H, vinilo aromático H), 6,88 (dd, $J = 8,97, 2,39$ Hz, 1H, vinilo aromático H), 7,19-7,44 (m, 5H, Ph-H) ppm; ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 10,6, 15,4, 28,7, 31,4, 105,5, 105,7, 110,5, 110,7, 123,7, 123,8, 128,0, 129,4, 129,7, 129,9, 131,0, 133,7, 138,9, 139,7, 144,6, 161,8, 164,2, 176,4 ppm; EM (IEN) m/z 345 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Anal. calcd para $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{FO}_2$: C, 78,24; H, 5,94. Hallado: C, 78,21; H, 5,55.

Ácido (Z)-2-(3-(4-iso-propilbencilideno)-6-fluoro-2-metil-3H-inden-1-il)acético (6d) (K-80003)



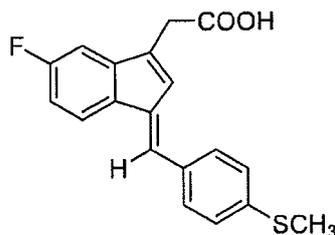
Sólido de color amarillo. Pf 146-149 °C; rendimiento: 79 %. IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ = 3025, 2958, 2871, 1701, 1629, 1603, 1507, 1464, 1412, 1315, 1293, 1171, 1134 cm^{-1} ; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,31 (d, $J = 6,95$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,20 (s, 3H, $\text{C}=\text{CCH}_3$), 2,97 (td, $J = 13,81, 6,91$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,59 (s, 2H, CH_2COO), 6,61-6,88 (m, 2H, vinilo aromático H), 7,19-7,46 (m, 6H, Ph-H); ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 10,6, 23,9, 31,3, 34,0, 76,7, 105,5, 105,7, 110,5, 110,7, 123,7, 123,8, 126,5, 129,4, 129,7, 129,8, 131,0, 133,7, 139,0, 139,6, 146,1, 146,2, 149,3, 161,8, 164,2, 176,1 ppm; EM (IEN) m/z 359 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Anal. calcd para $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{FO}_2$: C, 78,55; H, 6,29. Hallado: C, 78,13; H, 6,02.

2-(6-fluoro-3H-inden-1-il)acetato de etilo (5b)



A una solución de *iso*-propilamina (0,27 ml, 2 mmol) en THF anhidro (4 ml) a 0 °C se añadió gota a gota *n*-BuLi (solución 2,5 M en *n*-hexano, 0,8 ml, 2 mmol). Después de agitar durante aproximadamente 30 minutos, la mezcla se enfrió a -78 °C y se añadió EtOAc (0,2 ml, 2 mmol). Después de agitar a -78 °C durante otros 30 minutos, se añadió gota a gota indenona **4b** (150 mg, 1 mmol) en THF anhidro (0,7 ml). La mezcla se agitó a -78 °C durante otras 2 h y luego se enfrió con NH_4Cl saturado. La mezcla se extrajo con EtOAc (3x5 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se tomó con $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ (10/1,3 ml). Después de agitar durante 3 h a t.a., la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (3x5 ml). Los extractos combinados se lavaron sucesivamente con agua, NaHCO_3 saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (acetato de etilo: PE, 1:30) para dar **5b** en forma de un aceite incoloro (99 mg, 49 %). IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ = 3054, 2982, 2931, 1704, 1636, 1486, 1446, 1369, 1345, 1288, 1276 cm^{-1} ; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,28 (t, $J = 7,15$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 3,35 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$), 3,56 (dd, $J = 2,93, 1,51$ Hz, 2H, CH_2CH), 4,19 (c, $J = 7,15$ Hz, 2H, CH_3CH_2), 6,52 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 6,93-7,36 (m, 3H, Ph-H) ppm; ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 14,2, 34,1, 37,4, 61,0, 106,4, 106,7, 111,4, 111,6, 124,3, 124,4, 134,1, 136,3, 136,4, 139,2, 139,3, 146,3, 146,4, 161,1, 163,5, 170,72 ppm. Anal. calcd para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{FO}$: C, 70,90; H, 5,95. Hallado: C, 71,30; H, 6,23.

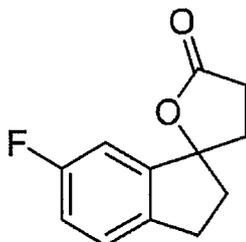
Ácido (E)-2-(3-(4-(metiltio)bencilideno)-6-fluoro-3H-inden-1-il)acético (6e) (K-80004)



A una solución de derivado de indeno **5b** (506 mg, 2,50 mmol) en MeOH (4 ml) se añadió NaOMe 2 N (4 ml, 4 mmol) a temperatura ambiente. Después de agitar durante 20 minutos, a la mezcla resultante se añadió *p*-(metiltio)benzaldehído (0,65 ml, 2,50 mmol). La mezcla se calentó a reflujo a 80 °C durante 3,5 h. La solución resultante se concentró a presión reducida, y después se vertió en HCl 1 N. Después de agitar durante 10 horas a t.a., la mezcla se extrajo con EtOAc (3x10 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro,

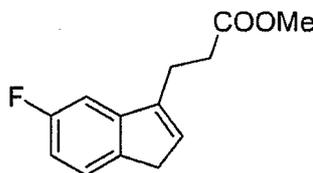
se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice (acetato de etilo: PE, 1:2,5) para dar isómero *trans* (E) **6e** (K-80004) en forma de un sólido de color amarillo (429 mg, 48 %). Pf 180-182 °C (EtOAc). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 2,54 (s, 3H, SCH₃), 3,69 (s, 2H, CH₂COO), 7,09-7,84 (m, 9H, Ph-H), 12,52 (s, 1H, COOH) ppm; ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 13,6, 115,5, 115,7, 127,3, 131,7, 131,8, 139,9, 161,5, 163,9, 174,0 ppm. Anal. calcd para C₁₉H₁₅FO₂S: C, 69,92; H, 4,63; F, 5,82; O, 9,80; S, 9,82. Hallado: C, 70,16; H, 4,92.

Espiro(dihidro-2(3H)furanona-5-1'(2'H)(3'H)-6-fluoro-indano (7a)



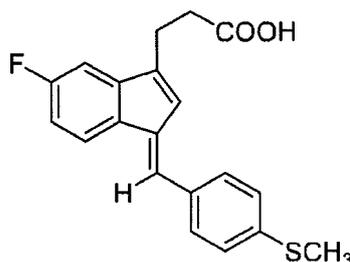
Una solución de 6-fluoro-1-indanona **4b** (75,0 mg, 0,50 mmol), *isopropanol* (0,190 ml, 2,50 mmol) y metil acrilato (0,45 ml, 5 mmol) en THF (10 ml) se purgó con argón durante 20 minutos y se enfrió a 0 °C. Se añadió una solución de Sml₂ (1,50 mmol) en THF (15 ml) a través de una aguja de transferencia. Después de 5 min, la reacción se enfrió con K₂CO₃ sat. (2 ml). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3x3 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc-PE (1:6) para dar el compuesto **7a** (74,5 mg, 0,37 mmol, 73 %) en forma de un aceite incoloro; IR (película) $\nu_{\text{máx}}$: 3058, 2945, 2856, 1766, 1603, 1494, 1155 cm⁻¹; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 2,28-2,52 (m, 4H, ArCCH₂), 2,77 (dt, *J* = 8,0, 1,2 Hz, 2H, ArCCH₂CH₂CO), 2,81-2,90 (m, 1H, ArCH₂), 3,00-3,09 (m, 1H, ArCH₂), 6,96-7,03 (m, 2H, Ar-H), 7,18-7,23 (m, 1H, Ar-H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 28,7, 29,5, 33,3, 39,4, 94,1, 109,7 (d, *J*_{C-F} = 22,4 Hz) 116,6 (d, *J*_{C-F} = 22,5 Hz), 126,2 (d, *J*_{C-F} = 8,3 Hz), 138,8, 144,7 (d, *J*_{C-F} = 7,4 Hz), 162,2 (d, *J*_{C-F} = 233,5 Hz), 176,0 ppm; Anal. calcd para C₁₂H₁₁FO₂: C, 69,89; H, 5,38. Hallado: C, 69,97; H, 5,62.

3-(6-fluoro-3H-inden-1-il)propanoato de metilo (8a)



A una solución de espiro(dihidro-2(3H)furanona-5-1'(2'H)(3'H)-6-fluoro-indano **7a** (61 mg, 3 mmol) en CH₃OH (1,5 ml) se añadió *p*-TsOH (6 mg). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas. La reacción se enfrió con una solución saturada acuosa de NaHCO₃ (2,0 ml). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3x2 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc-PE (1:300) para dar el compuesto **8a** (61 mg, 0,28 mmol, 94 %) en forma de un aceite de color amarillo pálido. IR (película) $\nu_{\text{máx}}$: 2959, 2901, 1739, 1585, 1606, 1473, 1254, 1162 cm⁻¹; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 2,68-2,73 (m, 2H, CH₂COO), 2,82-2,88 (m, 2H, ArCCH₂), 3,28-3,31 (m, 2H, ArCH₂), 3,71 (s, 3H, COOCH₃), 6,30 (t, 1H, *J* = 1,6 Hz, Ar=C-H), 6,83-6,91 (m, 1H, Ar-H), 7,02-7,06 (m, 1H, Ar-H), 7,33-7,38 (m, 1H, Ar-H); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 22,9, 32,4, 37,3, 51,7, 106,0 (d, *J*_{C-F} = 23,1 Hz), 111,4 (d, *J*_{C-F} = 22,8 Hz), 124,4 (d, *J*_{C-F} = 8,9 Hz), 130,3, 139,5, 142,4 (d, *J*_{C-F} = 3,0 Hz), 146,9 (d, *J*_{C-F} = 8,5 Hz), 162,4 (d, *J*_{C-F} = 240,6 Hz), 173,4 ppm; Anal. calcd para C₁₃H₁₃FO₂: C, 70,90; H, 5,95. Hallado: C, 70,50; H, 5,97.

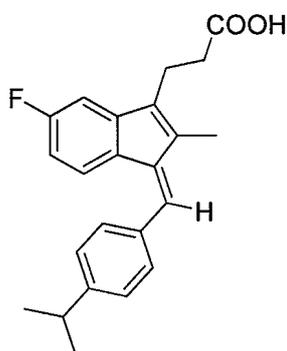
3-(3-(4-(metiltio)bencilideno)-6-fluoro-3H-inden-1-il)propanoato de (E)-metilo (9a) (K-80005)



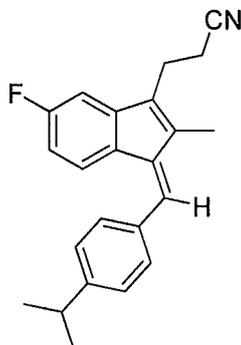
Una solución de 3-(6-fluoro-3H-inden-1-il)propanoato de metilo **8a** (110 mg, 0,5 mmol) en CH₃OH (1 ml) se purgó

5 con nitrógeno durante 10 minutos y se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota una solución de CH₃ONa (0,75 mmol) recién preparado en CH₃OH (1 ml). Después de agitar durante 30 minutos, se añadió gota a gota 4-(metiltio)benzaldehído (63 µl, 0,6 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas. Después de enfriar, la reacción se enfrió con agua (3 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla se acidificó con HCl 1 M para alcanzar un pH = 4. El disolvente se evaporó a presión reducida, y el residuo se extrajo con EtOAc (3x5 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc-PE (1:4) para dar el isómero *trans* (*E*) **9a** (112 mg, 66 %) en forma de un sólido de color amarillo. Pf.: 182-184 °C (EtOAc); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$: 3055, 2988, 2925, 1711, 1640, 1488, 1445, 1656, 1290, 1277 cm⁻¹;
 10 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 2,53 (s, 3H, SCH₃), 2,68 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz, CH₂COO), 2,84 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz, ArCCH₂), 6,96-7,84 (m, 9H, Ar-H), 12,21 (s, COOH); ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 14,3, 22,6, 32,0, 106,1 (d, *J*_{C-F} = 23,4 Hz), 111,5 (d, *J*_{C-F} = 23,0 Hz), 120,5 (d, *J*_{C-F} = 9,2 Hz), 122,6, 125,8 (2C), 127,3, 130,4 (2C, 132,8, 134,1, 136,4, 139,4, 143,2 (d, *J*_{C-F} = 8,8 Hz), 146,3, 162,2 (d, *J*_{C-F} = 240,5 Hz), 173,8 ppm; Anal. calcd para C₂₀H₁₇FO₂S: C, 70,57; H, 5,03; S, 9,42. Hallado: C, 70,20; H, 4,62; S, 9,01.

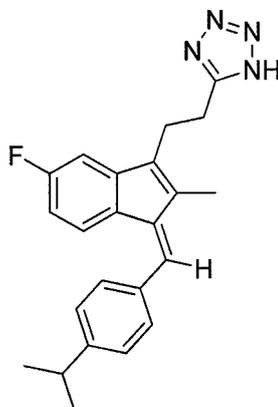
15 **K-80003 análogo n.º 1 (variante R1; sólido amarillo):**



K-80003 análogo n.º 2 (variante R1; sólido amarillo):

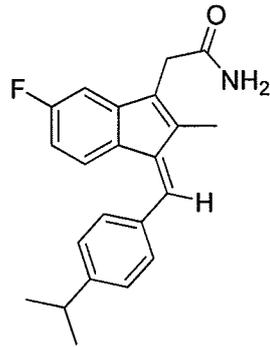


K-80003 análogo n.º 3 (variante R1; sólido amarillo):

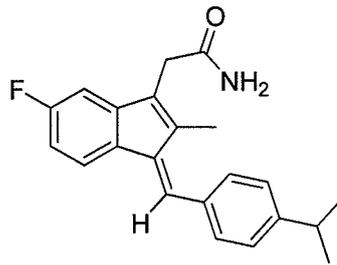


20

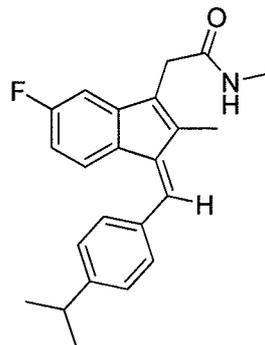
K-80003 análogo n.º 4 (variante R1; sólido amarillo):



K-80003 analógico n.º 5 (variante R1; sólido amarillo):

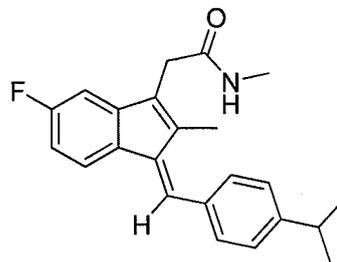


K-80003 analógico n.º 6 (variante R1; sólido amarillo):

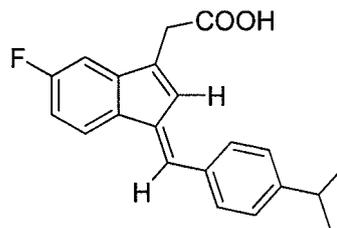


5

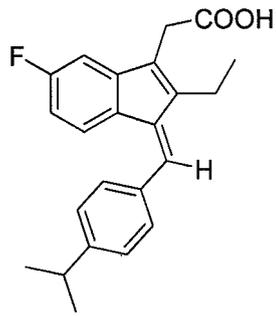
K-80003 analógico n.º 7 (variante R1; sólido amarillo):



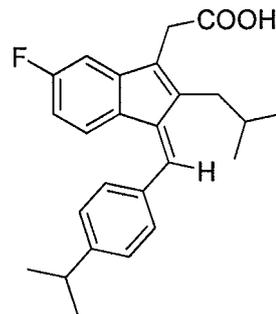
K-80003 analógico n.º 8 (variante R2; sólido amarillo):



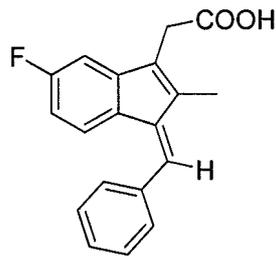
10 K-80003 analógico n.º 9 (variante R2; sólido amarillo):



K-8003 analógico n.º 10 (variante R2; sólido amarillo):

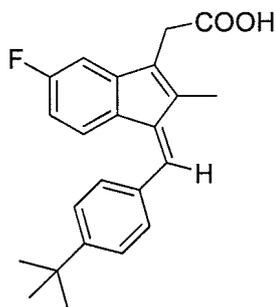


K-8003 analógico n.º 11 (variante R3; sólido amarillo):

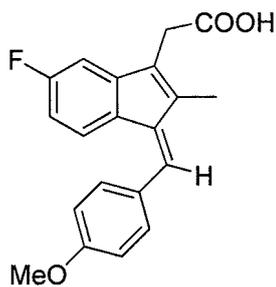


5

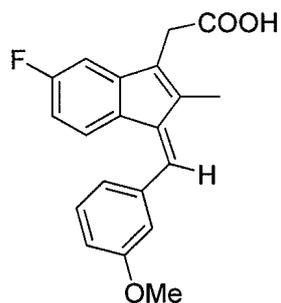
K-8003 analógico n.º 12 (variante R3; sólido amarillo):



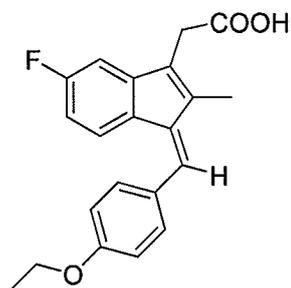
K-8003 analógico n.º 13 (variante R3; sólido amarillo):



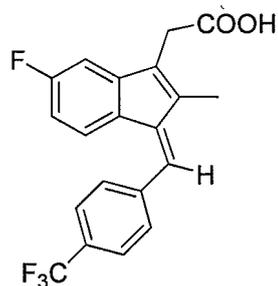
K-80003 analógico n.º 14 (variante R3; sólido amarillo):



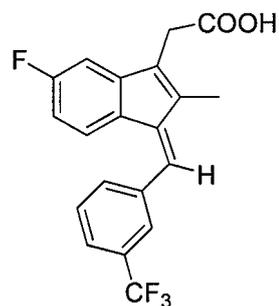
K-80003 analógico n.º 15 (variante R3; sólido amarillo):



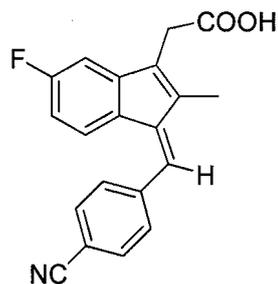
5 K-80003 analógico n.º 16 (variante R3; sólido amarillo):



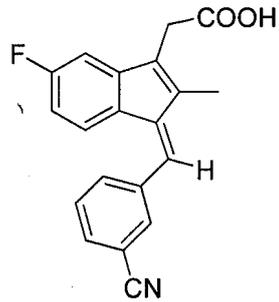
K-80003 analógico n.º 17 (variante R3; sólido amarillo):



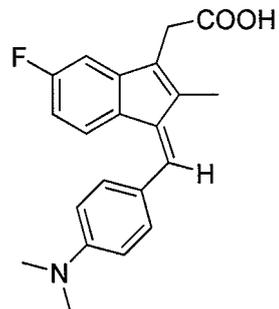
K-80003 analógico n.º 18 (variante R3; sólido amarillo):



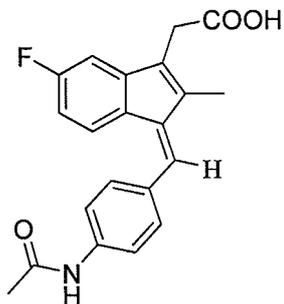
K-80003 analógico n.º 19 (variante R3; sólido amarillo):



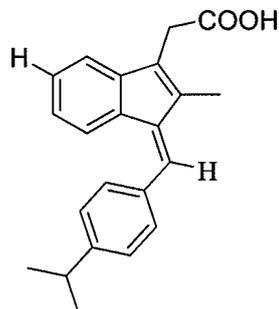
K-80003 analógico n.º 20 (variante R3; sólido amarillo):



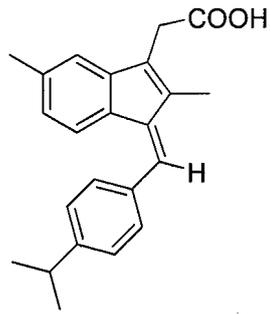
5 K-80003 analógico n.º 21 (variante R3; sólido amarillo):



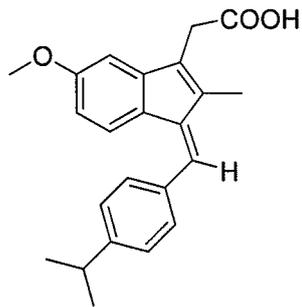
K-80003 analógico n.º 22 (variante R4; sólido amarillo):



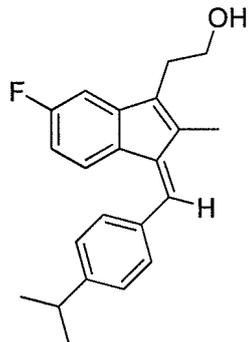
K-80003 analógico n.º 23 (variante R4; sólido amarillo):



K-80003 analógico n.º 24 (variante R4; sólido amarillo):

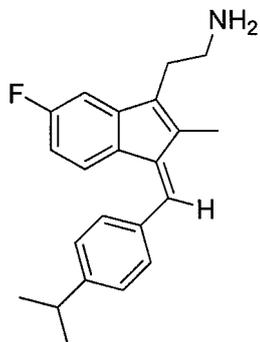


K-80003 analógico n.º 25 (variante R1):

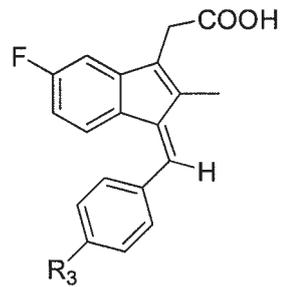


5

K-80003 analógico n.º 26 (variante R1):

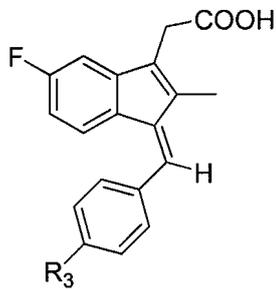


K-80003 analógico n.º 27 (variante R3):



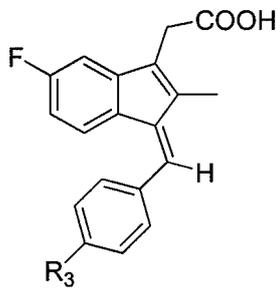
donde $R_3 = 2\text{-CN}$.

K-80003 analógico n.º 28 (variante R3):

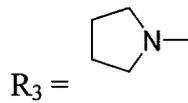


en el que $R_3 = 2\text{-CF}_3$.

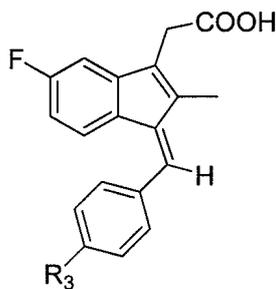
5 **K-80003 analógico n.º 29 (variante R3):**



en el que

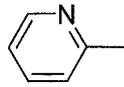


K-80003 analógico n.º 30 (variante R3):



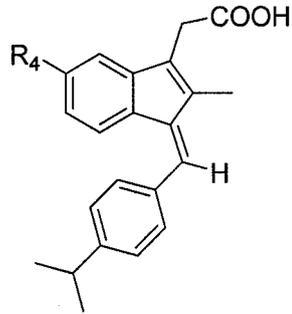
10

en el que



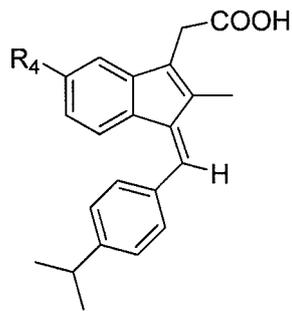
R₃ =

K-80003 analógico n.º 31 (variante R4):



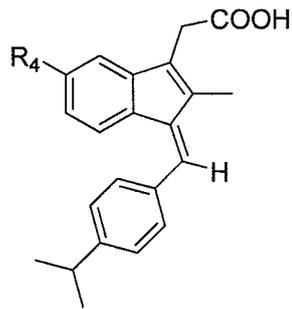
en el que R₄ = Et.

5 **K-80003 analógico n.º 32 (variante R4):**



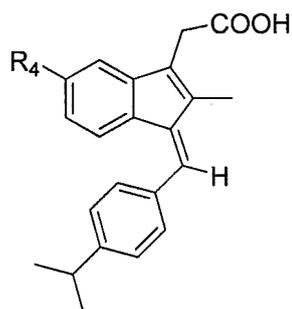
en el que R₄ = EtO.

K-80003 analógico n.º 33 (variante R4):



10 en el que R₄ = *i*-Pr.

K-80003 analógico n.º 34 (variante R4):



en el que R₄ = Cl.

Sumario de los procedimientos

Plásmidos

5 La construcción de RXR α y Myc-RXR α se ha descrito (Kolluri, SK y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 102(7), 2525-2530 (2005); Cao, X., y col., Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis [corrected] by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. Mol Cell Biol 24(22), 9705-9725 (2004); Masia, S. y col., Rapid, nongenomic actions of retinoico acid on fosfatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoico acid receptor. Mol Endocrinol 21 (10), 2391-2402 (2007); Ohashi, E y col., Cancer Res 69 (8), 3443-3450 (2009); Balkwill, F., Nat Rev Cancer 9 (5), 361-371 (2009); Han, YH y col., Oncogene 25 (21), 2974-2986 (2006)). Flag-p85 α se construyó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) usando el cebador directo, 5'-ccggaattccatgagtgtgctgagggtacc-3' y el cebador inverso, 5'-acgcgtcgactcatgcctctgctgtgcat-3'. El producto de la RCP se digirió con Eco RI y Sal I y se clonó en el vector pCMV-Flag. Los mutantes RXR α se construyeron usando el kit de mutagénesis QUIKCHANGE® (Stratagene, La Jolla, CA) con los siguientes oligonucleótidos como cebadores: RXR α /F313S/R316E, 5'-GGAACGAGCTGCTGATCGCCTCCTCCACGAGTCCATAGCTGTGAAAGAT GGG (directo - SEQ ID NO:1) y 5'-CCCATCTTTACACGCTATGGACTCGTGGGAGGAGGCGATCAGCAGCTCG TTCC (inverso - SEQ ID NO:2); RXR α / Δ 80, 5'-CCGGAATTCGGaccacaccacctgggc-3' (directo - SEQ ID NO:3) y 5'-CCGCTCGAGctaagtcatttgggtcggcg-3' (inverso - SEQ ID NO:4); RXR α / Δ 100, 5'-CCGGAATTCGGtcagcagcagcagggac-3' (directo - SEQ ID NO:5) y 5'-CCGCTCGAGctaagtcatttgggtcggcg-3' (inverso - SEQ ID NO:6). Los productos de la RCP se digirieron con EcoR I y Xho I y se ligaron en el vector pCMV-Myc.

Cultivo de células

El cáncer de mama humano ZR-75-1, el cáncer de próstata LNCaP y PC3, y las células de cáncer de pulmón H460 se cultivaron en RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal (SFB) al 10 %. El cáncer de hígado HepG2 y las células cancerosas humanas MCF-7 se mantuvieron en MEM que contenía un SFB al 10 %. Las células de riñón embrionario humano HEK293T, las células de riñón de mono verde CV-1, las células FER, células de cáncer de pulmón humano A549, las células de queratinocitos humanos HaCat, las células de riñón de hámster BHK, las células de carcinoma de cáncer de colon humano Caco2, las células de adenocarcinoma de colon humano SW480 y las células de colon humano HCT116 se mantuvieron en DMEM suplementado con SFB al 10 %. La línea celular de carcinoma embrionario murino F9 tenía ambos alelos de RXR α interrumpidos (Clifford, J. y col., Embo J 15 (16), 4142-4155 (1996)). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂.

Anticuerpos y reactivos

Anti-phospho-Akt (Ser 473, D9E, n.º 4060) fue de Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Los anticuerpos anti- β -actina (A1978) y anti-Flag (M2, F3165) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El anticuerpo anti-p85 α (n.º 06-195) se adquirió en Millipore (Billerica, MA). Los anticuerpos para Akt1 (C-20) sc-1618, GFP (B-2) sc-9996, HSP60 (N-20) sc-1052, c-Myc (9E10) sc-40PI3, RAR γ (C-19) sc-550, RXR α (D20) sc-553, RXR α (Δ N197) sc-774, PARP (H-250) sc-7150 eran de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). ECL, los anticuerpos IgG anti-conejo y anti-ratón específicos de especies ligadas a la peroxidasa de rábano picante fueron de GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). La IgG anti-conejo de cabra ALEXA FLUOR® 594 (A-11012) y la IgG anti-ratón de cabra ALEXA FLUOR® 488 (A-10667) se adquirieron en Invitrogen (Carlsbad, CA). La proteína A/G Plus-agarosa (sc-2003) fue de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El TNF α humano recombinante (210-TA) fue de R&D Systems (Minneapolis, MN). Los comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa eran de Roche (Basilea, Suiza). 9-*cis* ácido retinoico (9-*cis*-AR) (R4643). sulindac sulfuro y sus análogos se disolvieron en dimetilsulfóxidos (DMSO) en soluciones madre de 100 Mm. El ácido todo-trans-retinoico (ATRA) (R2625) y la quimotripsina fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). SR11237 fue proporcionado amablemente por la Dr. Marcia I. Dawson (Instituto Burnham).

Ensayo de unión a ligandos

El dominio de unión al ligando RXR α (LBD) marcado con His expresado en bacterias (aa 223-462) se incubó con [³H]-9-*cis*-AR (Amersham Biosciences, R.U.) en un tampón de ensayo de unión a ligando en presencia o ausencia de diversas concentraciones de 9-*cis*-AR sin marcar o sulindac sulfuro. La proteína RXR α LBD fue capturada por perlas recubiertas de níquel. El 9-*cis*-AR radiomarcado unido se determinó en un contador de centelleo como se describe (Kolluri, SK y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 102(7), 2525-2530 (2005)).

Análisis HPLC de la unión de sulindac sulfuro a la proteína RXR α en células

El vector de expresión que contiene el receptor fusionado con la fusión TAP C-terminal (Stratagene, La Jolla, CA) se transfirió en células HEK293 usando un reactivo de transfección FuGene 6 (Roche, Basilea, Suiza). Las células se mantuvieron en crecimiento exponencial en medio completo, DMEM (Mediatech Inc., Herndon, VA) suplementado con suero de ternera al 10 % (SCS, Hyclone Logan, UT), glutamina 2 mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomocina (100 μ g/ml). Dos días después de la transfección, las células se cambiaron a un medio que contenía 400 mg/ml de G418 hasta 20 días después de la transfección, cuando las placas se clasificaron para colonias resistentes a los

fármacos. La expresión de la proteína de fusión RXR α se determinó mediante inmunotransferencia. Las células se cultivaron hasta la confluencia en cuatro placas de 150 mm y posteriormente se trataron con o sin sulindac sulfuro 100 mM durante 3 h. Después del tratamiento, las células se lavaron dos veces en 50 ml de PBS frío y la purificación basada en estreptavidina se llevó a cabo como se describe en el sistema TAP de mamíferos INTERPLAY™ (Stratagene, La Jolla, CA) manual hasta el lavado inicial de perlas de estreptavidina con un tampón de unión a estreptavidina proporcionado. Luego se añadió una porción de 0,1 ml de solución diluida de ácido sulfúrico (pH 2) seguido de 1,0 ml de acetonitrilo. Las muestras se agitaron con formación de vórtice durante 30 segundos en un agitador vortical y posteriormente se centrifugaron (1000 g x 5 min). La muestra líquida se transfirió luego a un segundo tubo y se evaporó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se disolvió nuevamente en 0,12 ml de fase móvil cromatográfica y se inyectó una porción de 0,1 ml en la HPLC. El análisis de HPLC se realizó usando la columna microsorb-mv 100-3 C18 100 x 4,6 (Varian, Palo Alto, CA). La fase móvil consistió en 4 % v/v de ácido acético acuoso y acetonitrilo (30:70) bombeado a un caudal de 1,0 ml/minuto. La detección del sulindac sulfuro se realizó con un detector de fotoarray (Waters modelo 2996, Waters Corporation, Milford, MA), que recolectó espectros entre 200 y 450 nM. Se usó una solución convencional de sulindac sulfuro para obtener la curva de calibración. El espectro característico del máximo y el tiempo de retención se usaron para la identificación, y las áreas de los máximos en los 4 máx usados para la cuantificación se calcularon usando el software MILLENNIUM CHROMATOGRAPHY MANAGER (Waters Corporation, Milford, MA). Se mostró uno de los tres experimentos similares.

Ensayo de protección proteolítica

RXR α LBD se sintetizó por transcripción-traducción *in vitro* usando lisados de reticulocitos de conejo (Promega, Fitchburg, WI) como se describió anteriormente (Kolluri, SK y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 102(7), 2525-2530 (2005); Zhang, XK y col., Nature 355 (6359), 441-446 (1992); Zhang, X.-K. y col., Nature. 358 (6387), 587-591 (1992)). RXR α -LBD marcada con ³⁵[S] metionina traducida *in vitro* se preincubó con disolvente (1 % de DMSO), sulindac (100 μ M) o 9-*cis*-AR (10⁻⁷ M) durante 30 minutos y luego se digirió con la concentración indicada de quimotripsina. Los fragmentos digeridos fueron separados por PAGE.

Ensayos de transfección transitoria

Las células (1 x 10⁵ células/pocillo) sembradas en placas de 24 pocillos se transfectaron transitoriamente usando un procedimiento de precipitación con fosfato de calcio modificado como se describe (Kolluri, SK y col., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 102(7), 2525-2530 (2005); CaO, X., y col., Mol Cell Biol 24(22), 9705-9725 (2004)).

Ensayos de apoptosis

Para el análisis de cambio morfológico nuclear, las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 3,7 % y se tiñeron con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (1 mg/ml) para visualizar los núcleos mediante microscopía fluorescente (Masia, S. y col., Rapid, nongenomic actions of retinoico acid on fosfatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoico acid receptor. Mol Endocrinol 21 (10), 2391-2402 (2007); Ohashi, E y col., Cancer Res 69 (8), 3443-3450 (2009); Balkwill, F., Nat Rev Cancer 9 (5), 361-371 (2009)). Los porcentajes de células apoptóticas se determinaron contando al menos 300 células positivas para GFP que tenían fragmentación nuclear y/o condensación de cromatina. Para la determinación de la fragmentación del ADN, se usó ELISA^{PLUS} de detección de muerte celular (Roche Applied Science, Penzberg, Bavaria, Germany). Se mostró uno de los tres experimentos similares.

RXR α y RAR γ ARNip

RXR α ARNip siGENOME SMARpool (M-003443-02), RAR γ ARNip siGENOME SMARpool (M-003439-01) y ARNip de control no específico IX (D-001206-09-05) se adquirieron en DHARMA CON (Lafayette, CO). Una parte alícuota de 2,5 μ l de ARNip 20 mM/por pocillo se transfectó en células cultivadas en placas de 12 pocillos usando reactivo de oligofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Dos días después de la transfección, las células se recogieron para transferencia de Western.

Inmunotransferencia

Para la inmunotransferencia, los lisados celulares se hirvieron en tampón de muestra SDS, se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS y se transfirieron a nitrocelulosa. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon en leche al 5 % en TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 %) que contenía el anticuerpo. Las membranas se lavaron tres veces con TBST, luego se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en leche al 5 % en TBST que contenía anti-inmunoglobulina unida a peróxido de rábano picante.

Ensayos de co-inmunoprecipitación (CoIP)

Para el ensayo de CoIP, las células o las células transfectadas con los vectores de expresión indicados se suspendieron en un tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 20 mM; NP-40 al 1 %; PMSF 1 mM; 50 mg/ml leupeptina; 20 mg/ml aprotinina; Na₃VO₄ 0,1 mM; y DTT 1 mM). Los extractos celulares se eliminaron

mediante incubación con las perlas de proteína A/G más agarosa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y luego se incubaron con el anticuerpo adecuado y 30 ml de perlas de proteína A o G más agarosa durante una noche a 4 °C. A continuación, las perlas se lavaron y se llevaron a ebullición en solución de carga de gel de Laemmli antes de realizar SDS-PAGE/inmunotransferencia usando anticuerpos policlonales o monoclonales. Los productos inmunorreactivos se detectaron mediante quimioluminiscencia con un sistema de quimioluminiscencia mejorado (ECL™) (Amersham Biosciences, Amersham, R.U.).

Clon estable de HeLa-RXR α /1-134 y ensayo de agar suave

El fragmento N-terminal RXR α , 1-134, se clonó en el vector pNTAP (Stratagene, La Jolla, CA). El pNTAP-RXR α /1-134 resultante se transfirió en células HeLa. 48 horas después de la transfección, las células se seleccionaron con 400 mg/ml de G418 durante 2 semanas. Se recogieron clones individuales y se examinaron mediante inmunotransferencia. El clon estable HeLa RXR α /1-134 y las células HeLa transfectadas con el vector pNTAP de control se sembraron a 5 x 10³ células/pocillo (placa de 6 pocillos) en DMEN suplementado con SFB al 10 % y agarosa al 0,35 % con agar en perla al 0,5 %. Después de 12 días de incubación a 37 °C, las colonias se tiñeron con cristal violeta al 0,005 % durante 1 h y se contaron.

Ensayo de formación de colonias

Se sembraron el clon HeLa RXR α /1-134 estable y las células HeLa de control en una placa de 6 pocillos, 350 células/pocillo. Cinco días después, las células se trataron con sulindac (50 μ M) y K-80003 (25 μ M) en medio de suero al 0,5 % durante 3 días. Después de lavar con PBS, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 20 minutos. Las colonias se tiñeron con cristal violeta al 0,1 % durante 30 minutos, y se tomaron fotografías y se contaron las colonias.

Tejidos humanos y evaluación

Los tejidos tumorales de mama e hígado y sus tejidos circundantes se obtuvieron mediante resección quirúrgica de pacientes con cáncer. Las muestras histológicas normales, que estaban a una distancia de aproximadamente al menos 3 cm del nódulo tumoral, se obtuvieron de los pacientes correspondientes. El estudio fue aprobado por el comité de ética de investigación biomédica del instituto universitario de Xiamen, y todos los pacientes dieron su consentimiento informado.

Se recogieron tejidos de pacientes con carcinoma hepatocelular primario (CHC, n = 6) o cáncer de mama (n = 6) para detectar la expresión de RXR α . Para el ensayo de inmunotransferencia, el tumor y sus tejidos circundantes se prepararon por separado y se lisaron en un tampón RIPA modificado. Los lisados se sometieron a electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 8 % y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron secuencialmente con anticuerpo Δ N197 anti-RXR α (1:1000) durante una noche a 4 °C y anticuerpo IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:5000) a temperatura ambiente durante 1 h, y se detectaron mediante quimioluminiscencia mejorada (ECL™) (Amersham Biosciences, Amersham, R.U.). Las transferencias separadas se reprobaron con anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (1:2000) para el control de carga. Para el análisis de inmunohistoquímica, las secciones de tejido se incubaron con el anticuerpo Δ N197 anti-RXR α (1:500) durante una noche a 4 °C y se detectaron con inmunoglobulinas específicas de anti-conejo de cabra (1:100) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina.

Microscopía confocal

Las células transfectadas con RXR α / Δ 80 marcada con Myc y p85 α marcada con Flag se sembraron en portaobjetos de cámara durante una noche. Las células se fijaron en PBS que contenía paraformaldehído al 3,7 % durante 10 minutos y se lavaron dos veces con PBS. Las células se permeabilizaron luego con 0,1 % de tritón X-100 en PBS durante 5 minutos. Las células fijadas se incubaron previamente durante 30 minutos en PBS que contenía BSA al 5 % a temperatura ambiente. Las células se tiñeron con anticuerpo policlonal anti-Myc (dilución 1:500) y anticuerpo anti-Flag (dilución 1:500) seguido de IgG anti-conejo conjugado con Cy3 (1:1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o IgG anti-ratón marcado con FITC (1:500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los datos de microscopía confocal que se muestran en el manuscrito son representativos de al menos tres experimentos similares.

Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular se realizó como se describe con modificaciones menores (Cao, X., y col., Mol Cell Biol 24(22), 9705-9725 (2004); Ohashi, E y col., Cancer Res 69 (8), 3443-3450 (2009)).

En resumen, las células (1 x 10⁷ células) suspendidas en 0,5 ml de tampón hipotónico (sacarosa 250 mM, HEPES-KOH 20 mM, pH 7,4, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EGTA 0,5 mM, EDTA 1,5 mM, pH 8,0, y DTT 1 mM) se homogeneizaron con inhibidores de proteinasa y los extractos celulares se centrifugaron a 800 x g durante 10 minutos. El sedimento que contenía los núcleos se resuspendió en 200 μ l de sacarosa 1,6 M en tampón hipotónico más inhibidores de proteasa y se colocó sobre 1 ml de sacarosa 2,0 M en el mismo tampón, luego se centrifugó a 150.000 x g durante 90 minutos a 4 °C para obtener la fracción nuclear. El sobrenadante se centrifugó a 10.000 x g durante 30 minutos a 4 °C para obtener fracciones citoplásmicas. Las fracciones nuclear y citoplásmica se

resuspendieron en 100 µl de tampón de lisis (Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1 %, EDTA 5 mM, pH 8,0) con un cóctel de inhibidores de proteinasa para el análisis de inmunotransferencia.

Ensayos de COX

- 5 El kit de ensayo de actividad fluorescente COX (700200), el kit de ensayo de detección de inhibidores fluorescentes COX (700100) y el kit de inmunoensayo enzimático de prostaglandina E2 (EIA) (514010) se obtuvieron en Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Los ensayos de actividad COX-1 y COX-2 se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Síntesis química

- 10 Los espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN se registraron en un espectrómetro Bruker AV 400 (Bremen, Alemania). Los espectros de ¹H RMN se registraron en el disolvente indicado y los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (δ) en relación con el Me₄Si interno. Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro Nicolet Avatar 360 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los espectros de masas se registraron con un Bruker Dalton Esquire 3000 plus (inyección directa ESI) (Bremen, Alemania). Los análisis elementales se realizaron usando un analizador Vario RL. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de punto de microfusión X-4 y no están corregidos. El 6-fluoro-1-indanona **4b** usado en este estudio está disponible en el mercado. El tetrahidrofurano se destiló antes del uso de cetil benzofenona de sodio. El diclorometano se destiló a partir de pentóxido de fósforo. El metanol se destiló a partir de limaduras de magnesio y yodo. Se usó gel de sílice (zhifu, malla 300-400) de Yantai Silica Gel Factory (China) para la cromatografía en columna, eluyendo (a menos que se indique lo contrario) con acetato de etilo/éter de petróleo (EP) (60-90 °C) mezcla o diclorometano/metanol.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA SANFORD-BURNHAM UNIVERSIDAD DE XIAMEN

<120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES RELACIONADAS CON UNA VÍA SELECTIVA DEL RECEPTOR DE RETINOIDES

<130> 24966EP

- 25 <140> 11 778 467,8

<141> 06/05/2011

<150> US 61/332.124

<151> 06/05/2010

<160> 7

- 30 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 29

<212> ADN

<213> Homo sapien

- 35 <400> 1

ccggaattcc atgagtgctg aggggtacc 29

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

- 40 <213> Homo sapien

<400> 2

acgcgtcgac tcatgcctc tgctgtgcat 30

<210> 3

<211> 56

- 45 <212> ADN

<213> Homo sapien

<400> 3

ggaacgagct gctgatgcc tcctctccc acgagtccat agctgtgaaa gatggg 56

- 50 <210> 4

<211> 56

ES 2 702 532 T3

<212> ADN
<213> Homo sapien

<400> 4
cccacatttc acagctatgg actcgtggga ggaggaggcg atcagcagct cgttcc 56

5 <210> 5
<211> 29
<212> ADN
<213> Homo sapien

10 <400> 5
ccggaattcg gaccacaccc accctgggc 29

<210> 6
<211> 29
<212> ADN
<213> Homo sapien

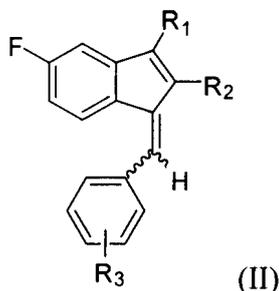
15 <400> 6
ccgctcgagc taagtcattt ggtgcggcg 29

<210> 7
<211> 29
<212> ADN
<213> Homo sapien

20 <400> 7
ccggaattcg ggtcagcagc agcgaggac 29

REIVINDICACIONES

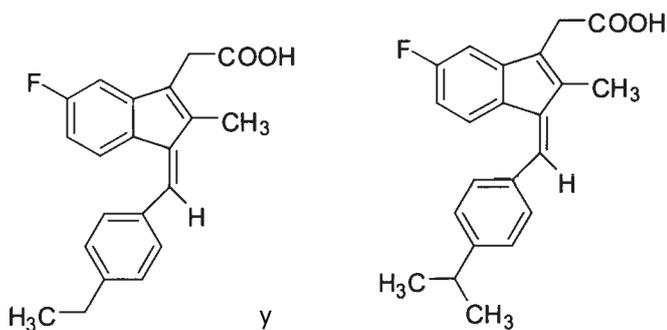
1. Un compuesto de fórmula (II) que tiene la estructura:



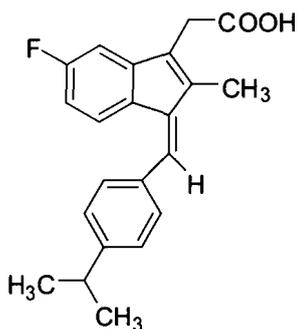
en la que:

- 5 R₁ se selecciona de entre el grupo que consiste en CH₂COOH y CH₂CH₂COOH;
 R₂ es CH₃; y
 R₃ se selecciona de entre el grupo que consiste en 4-CH₂CH₃ y 4-CH(CH₃)₂.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona de entre el grupo que consiste en:



10 3. El compuesto de la reivindicación 1 que tiene la estructura:



4. El compuesto una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en un procedimiento de prevención o tratamiento del cáncer en un mamífero, en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer colorrectal y cáncer de colon.

15 5. El compuesto una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en la prevención y tratamiento de cánceres en un sujeto con un riesgo elevado de cáncer en relación con la población general, en el que la unión del compuesto a RXR α en una célula cancerosa en el sujeto da como resultado la supresión de la actividad de AKT independiente de la vía de la ciclooxigenasa (COX).

20 6. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

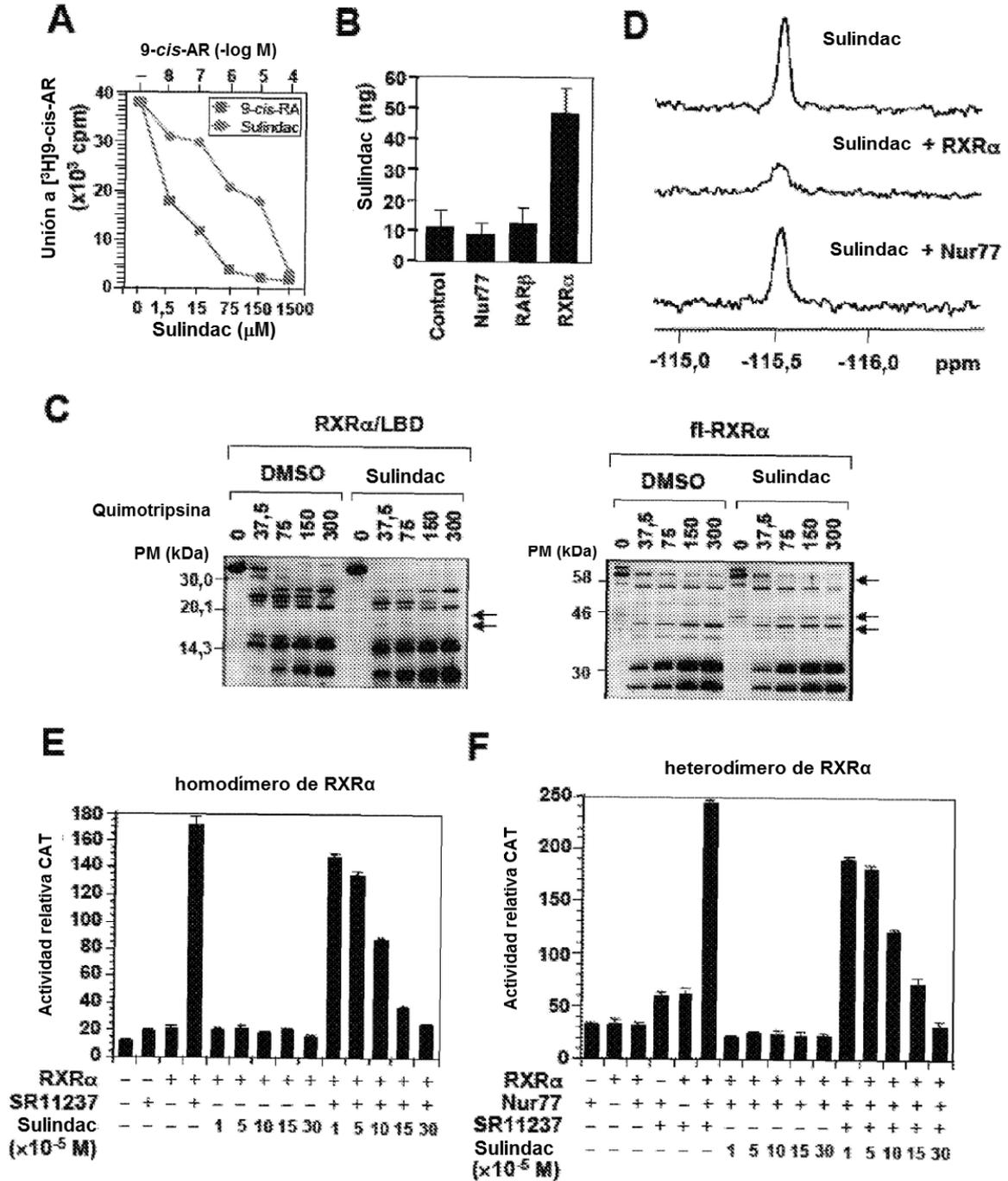


Figura 2

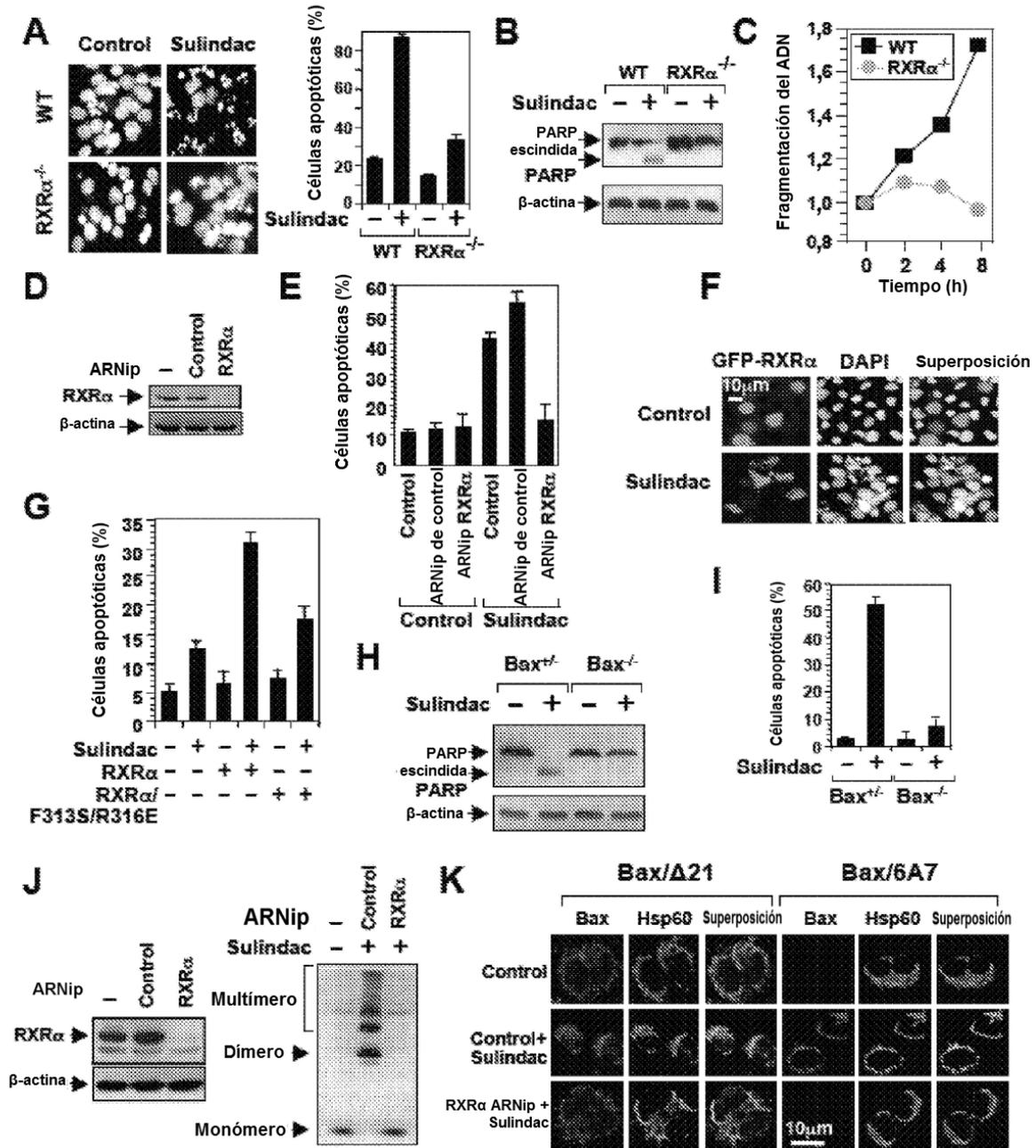


Figura 3

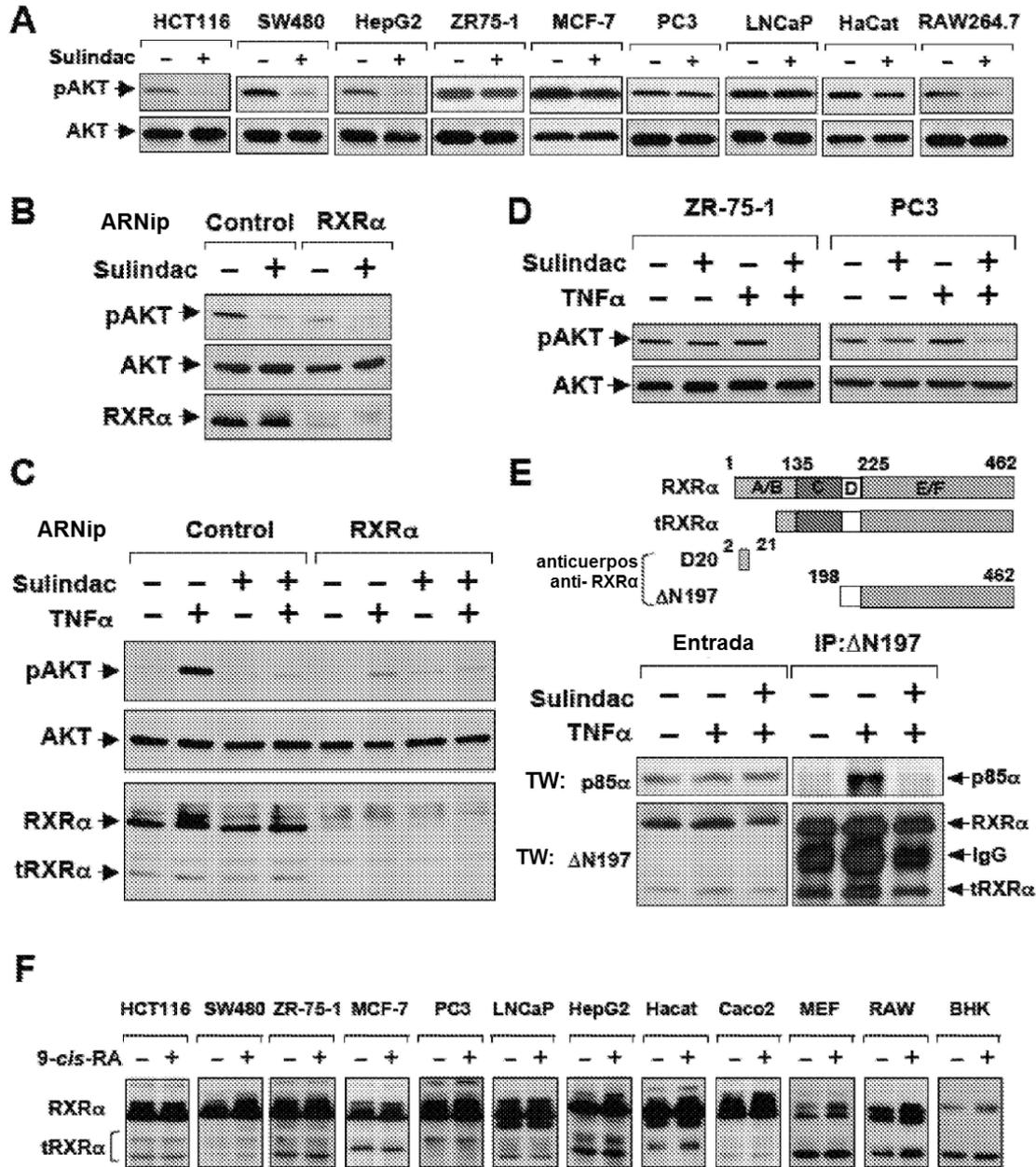


Figura 4

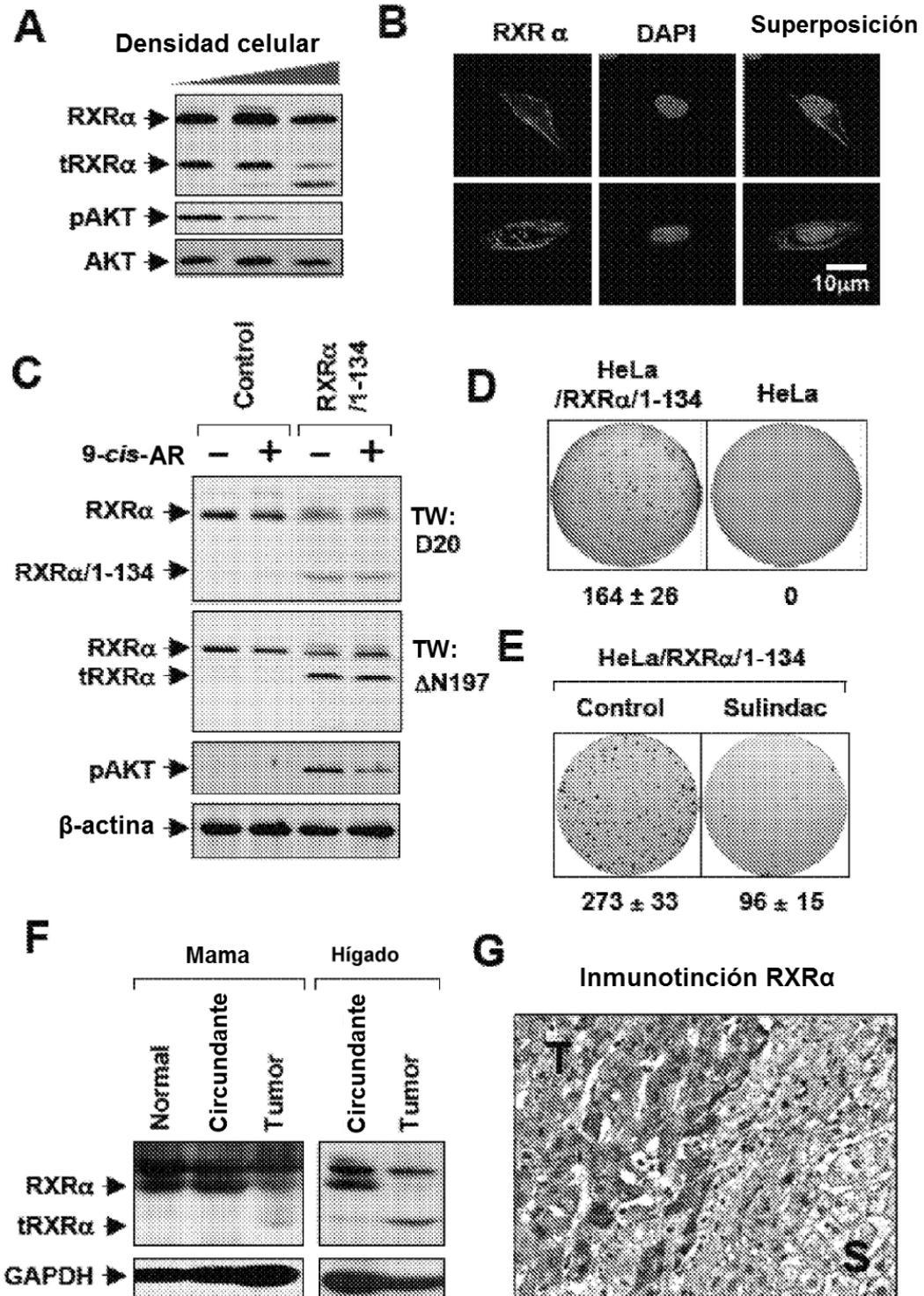


Figura 5

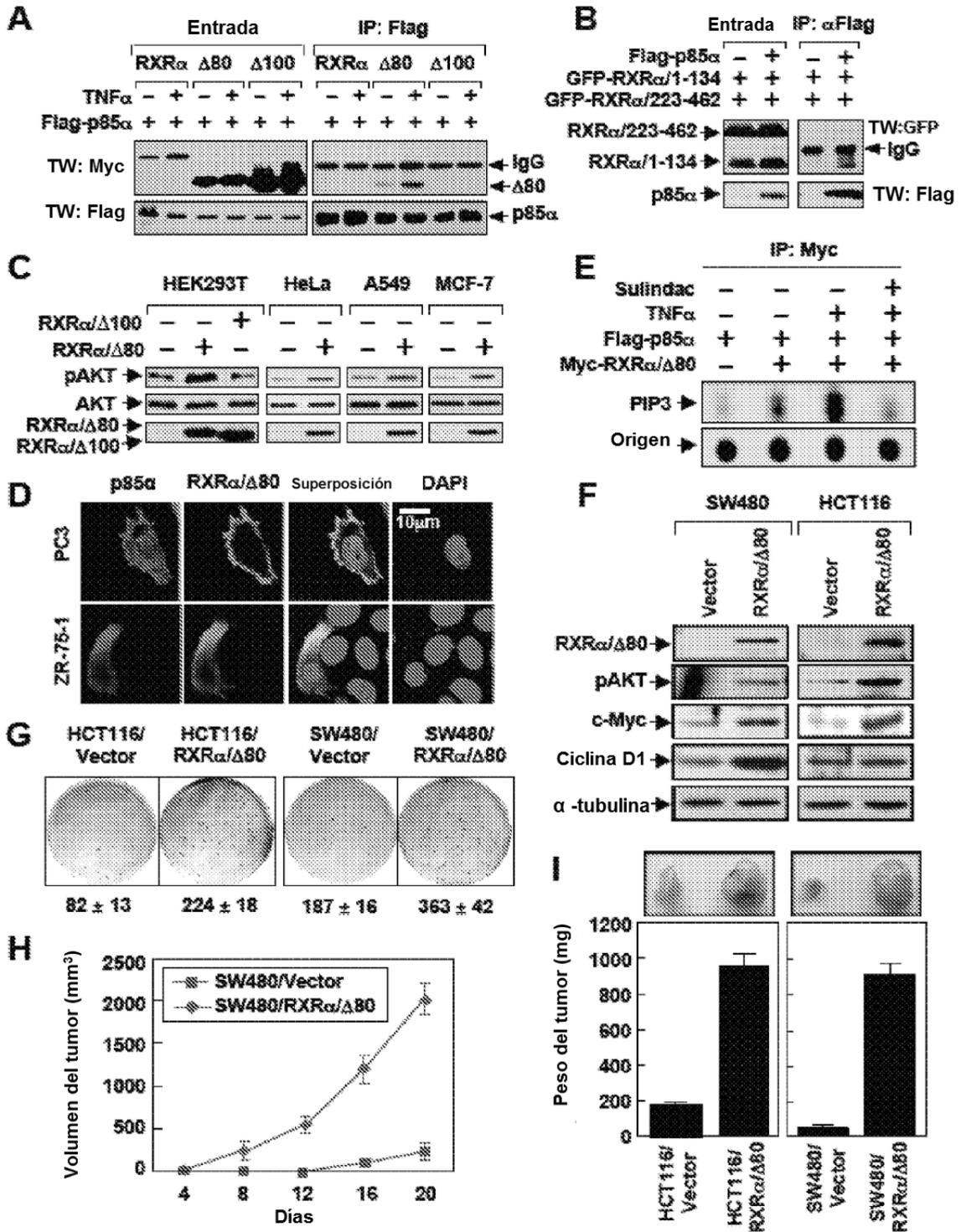


Figura 6

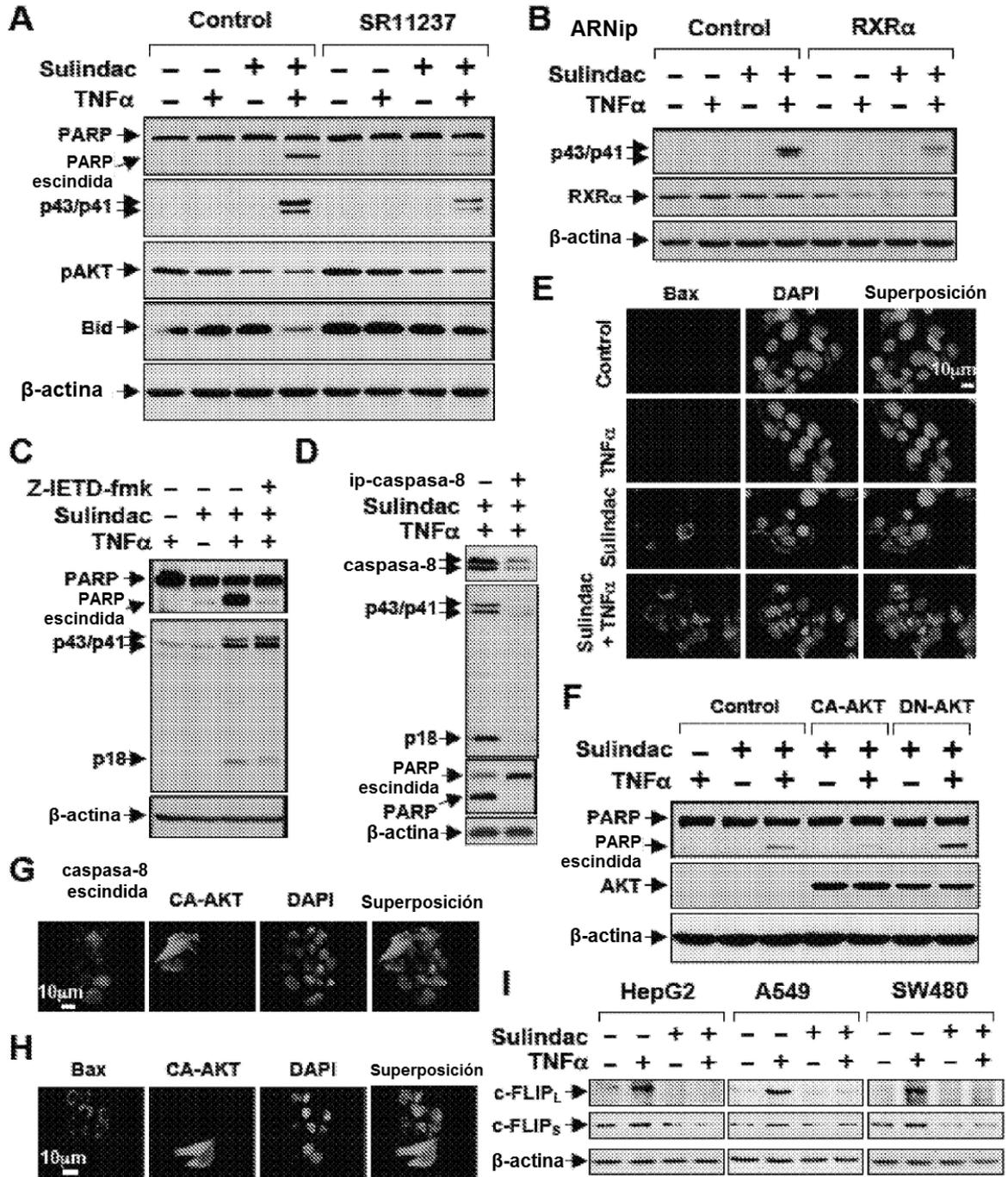


Figura 7

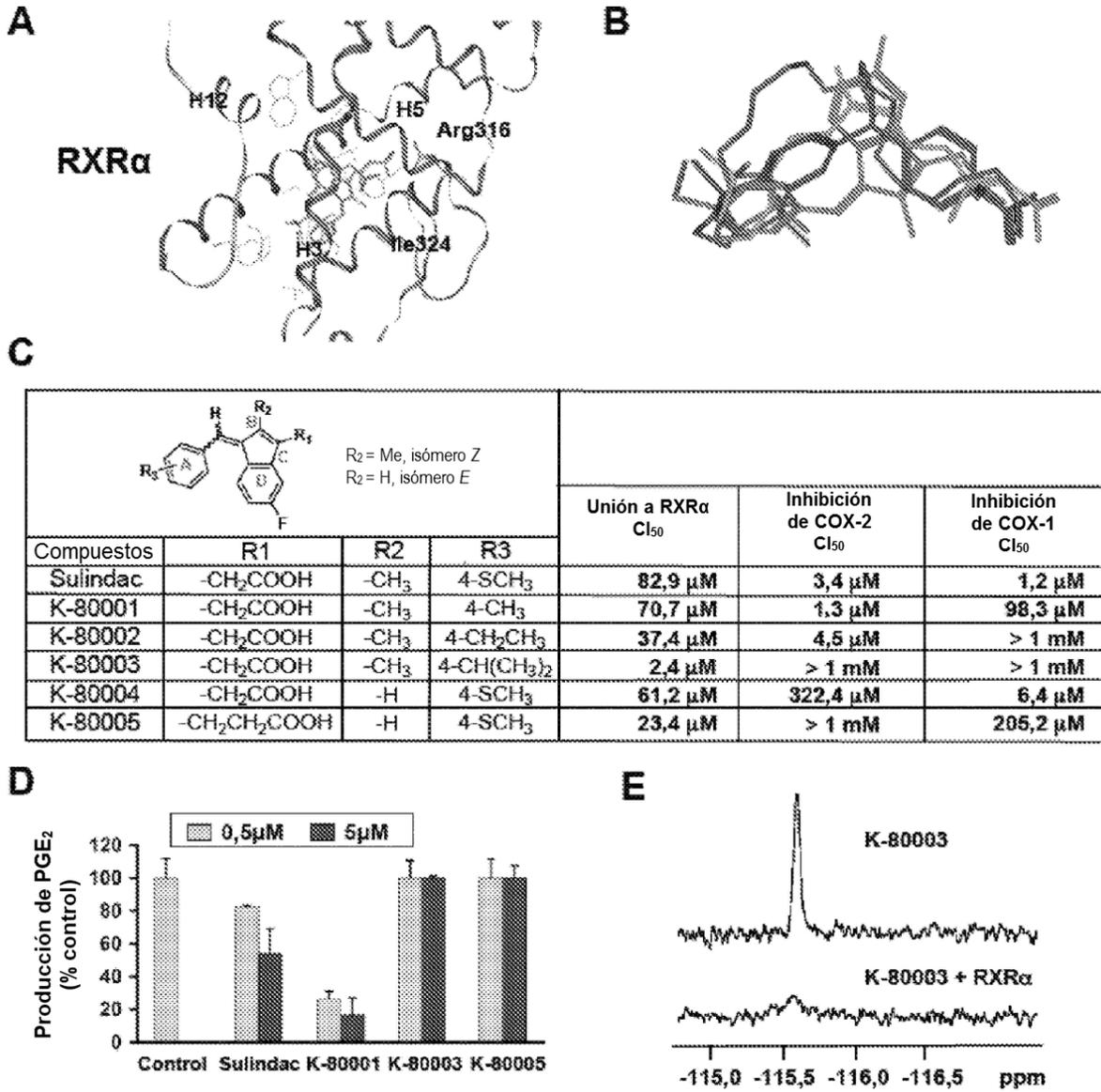


Figura 8

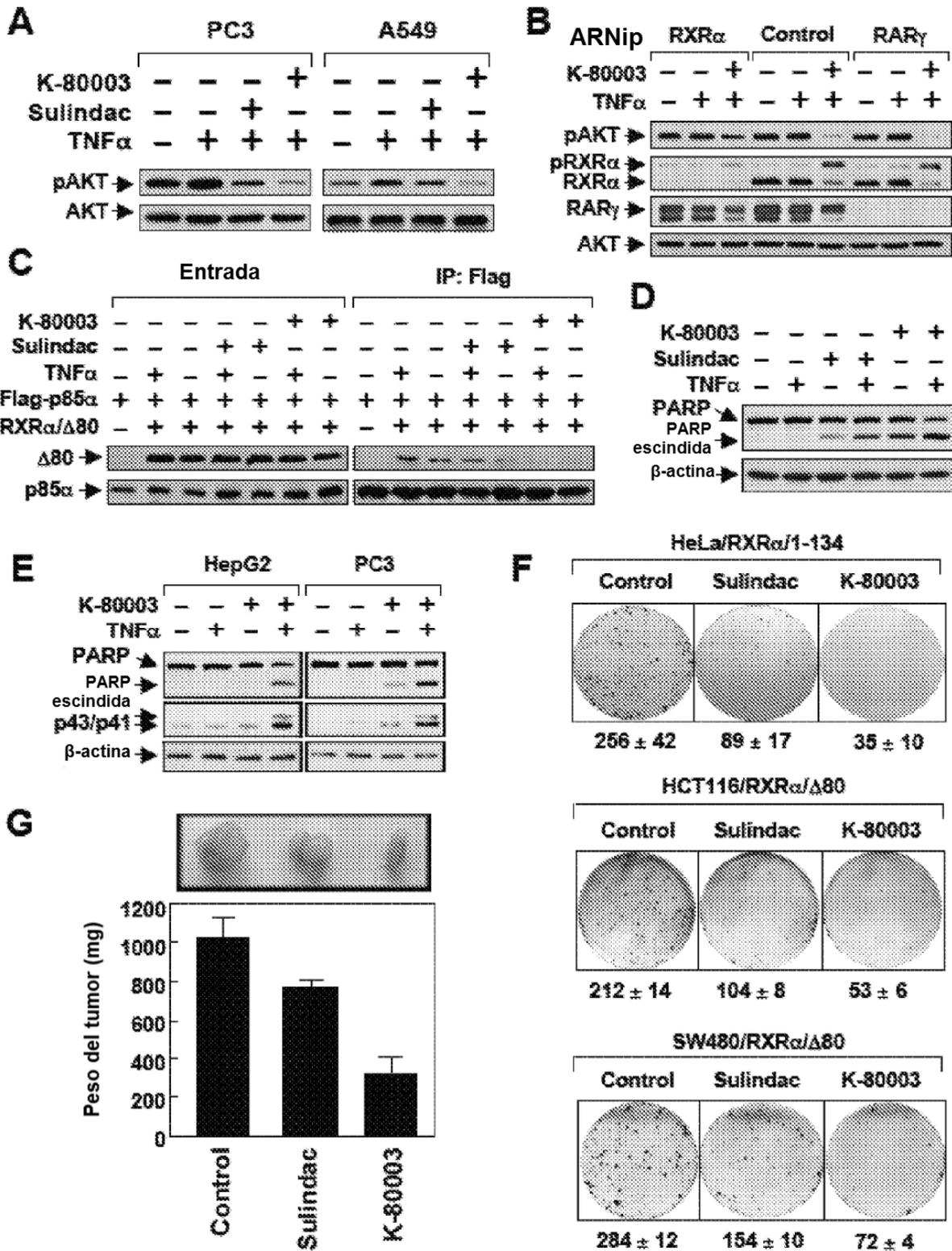


Figura 9

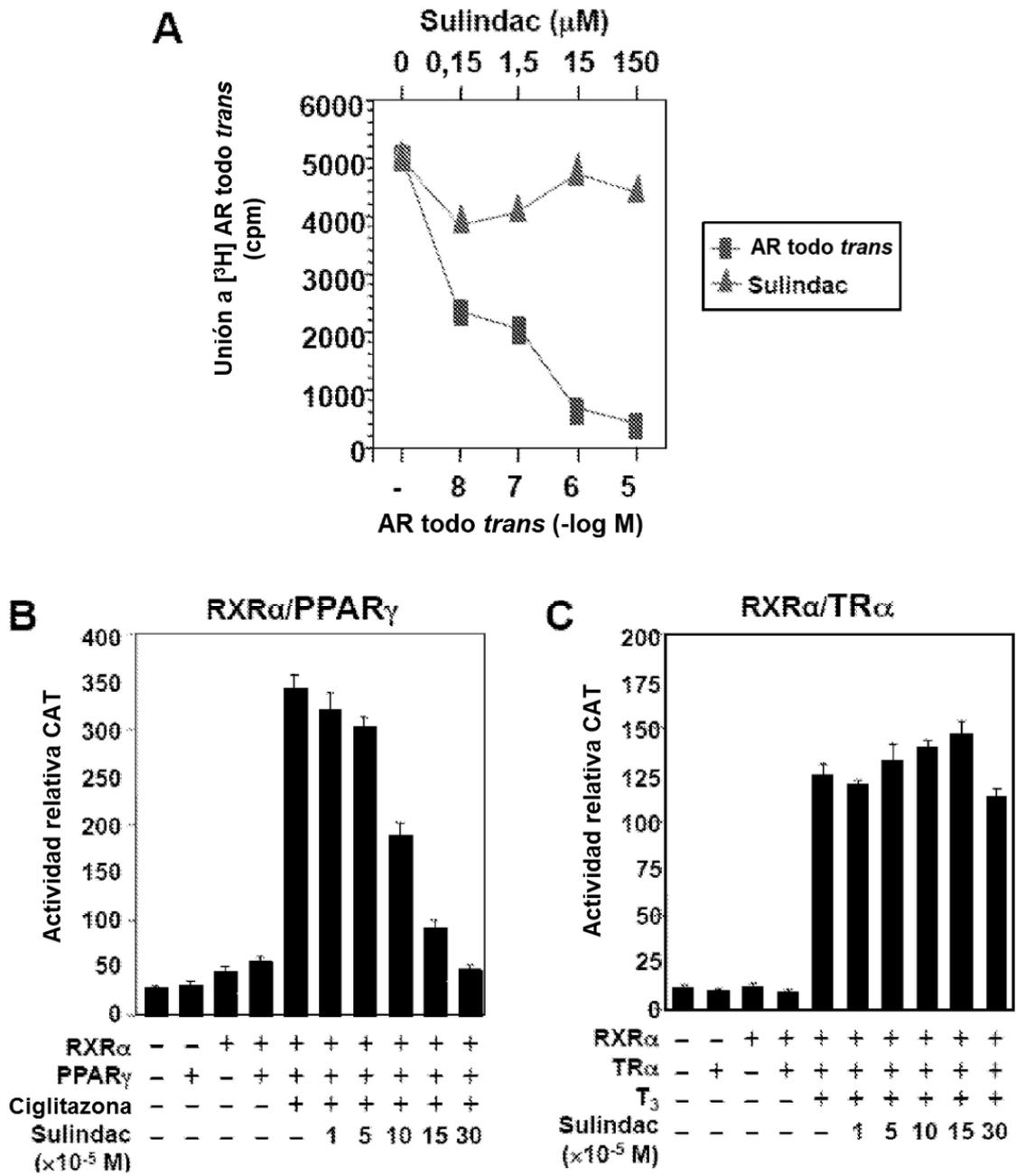
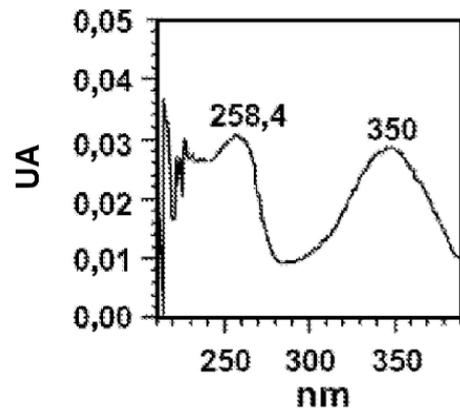
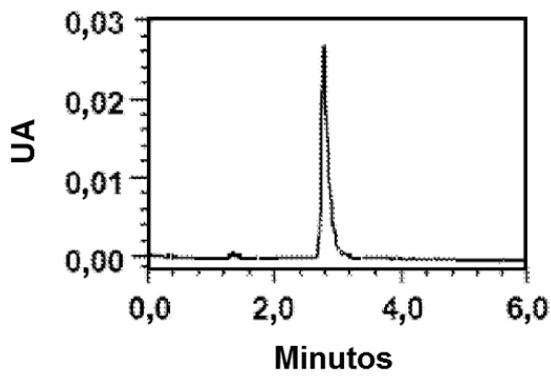
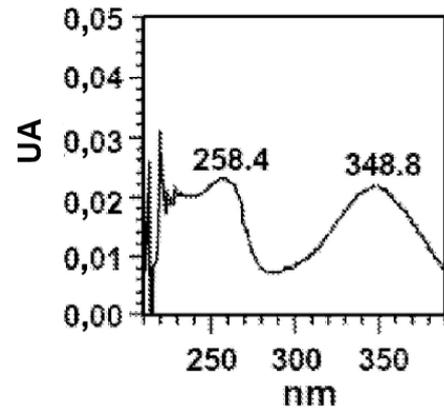
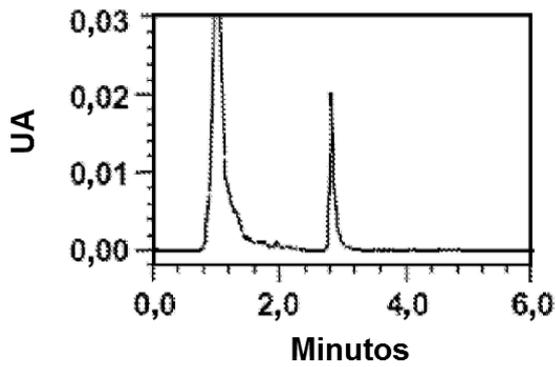


Figura 10

Sulindac de referencia



RXR α + Sulindac



RXR α de referencia

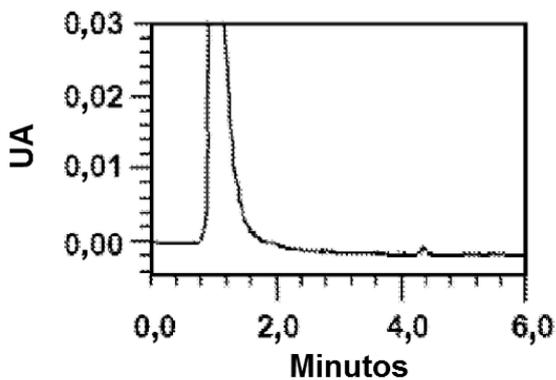


Figura 12

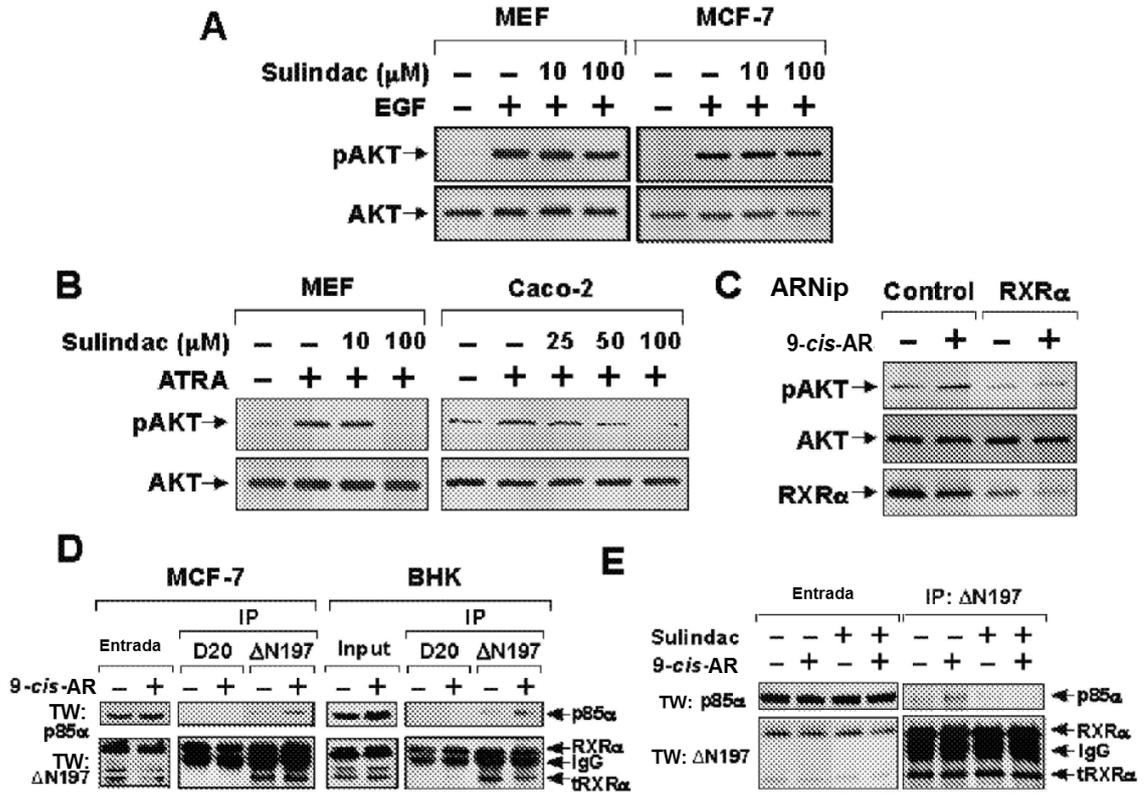


Figura 13

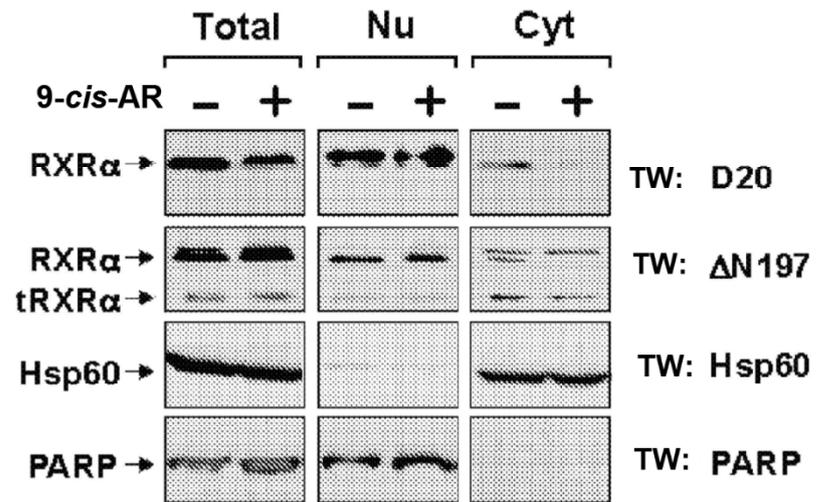


Figura 14

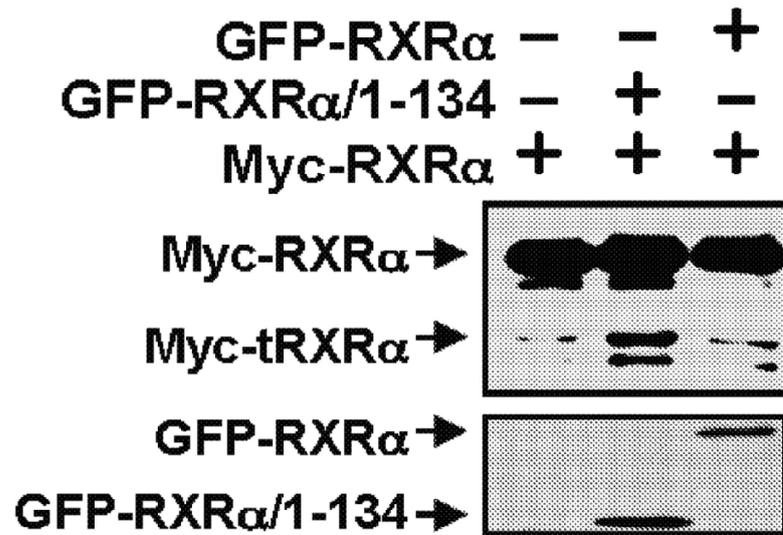
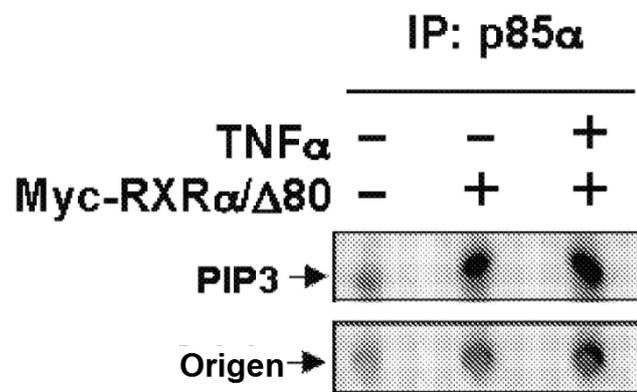


Figura 15

A



B

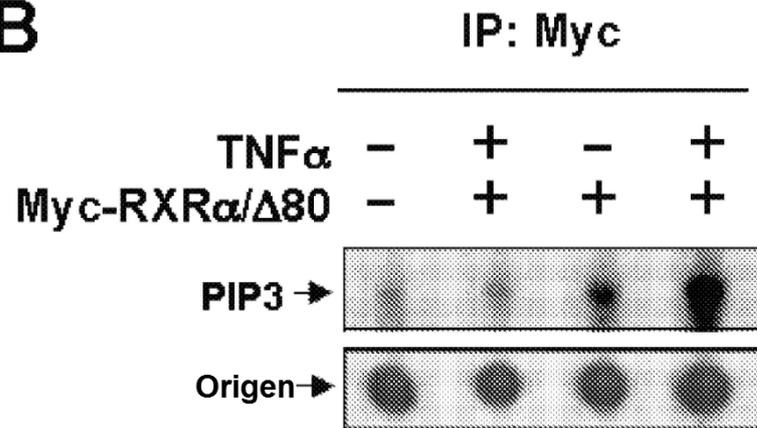


Figura 16

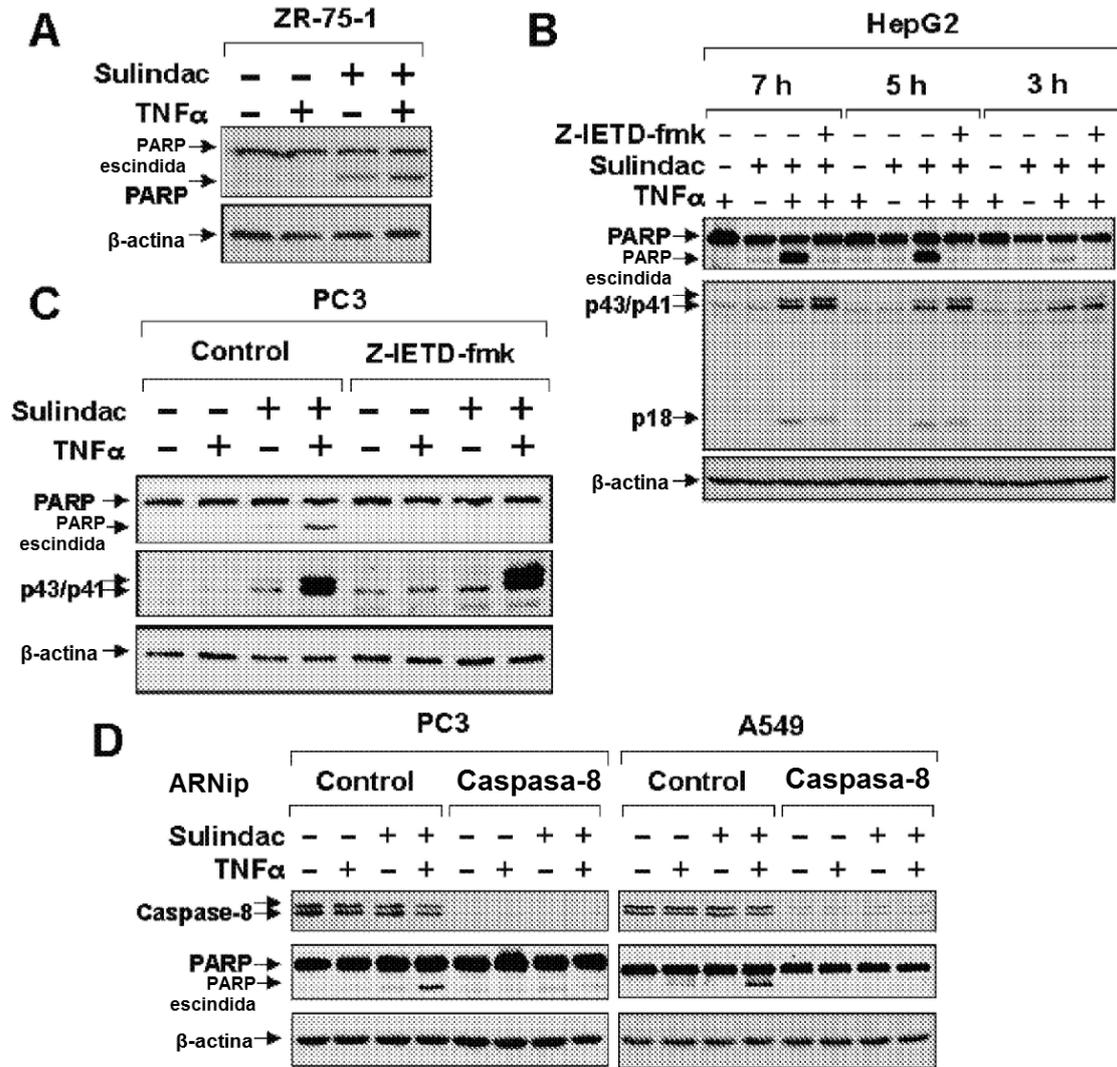


Figura 17

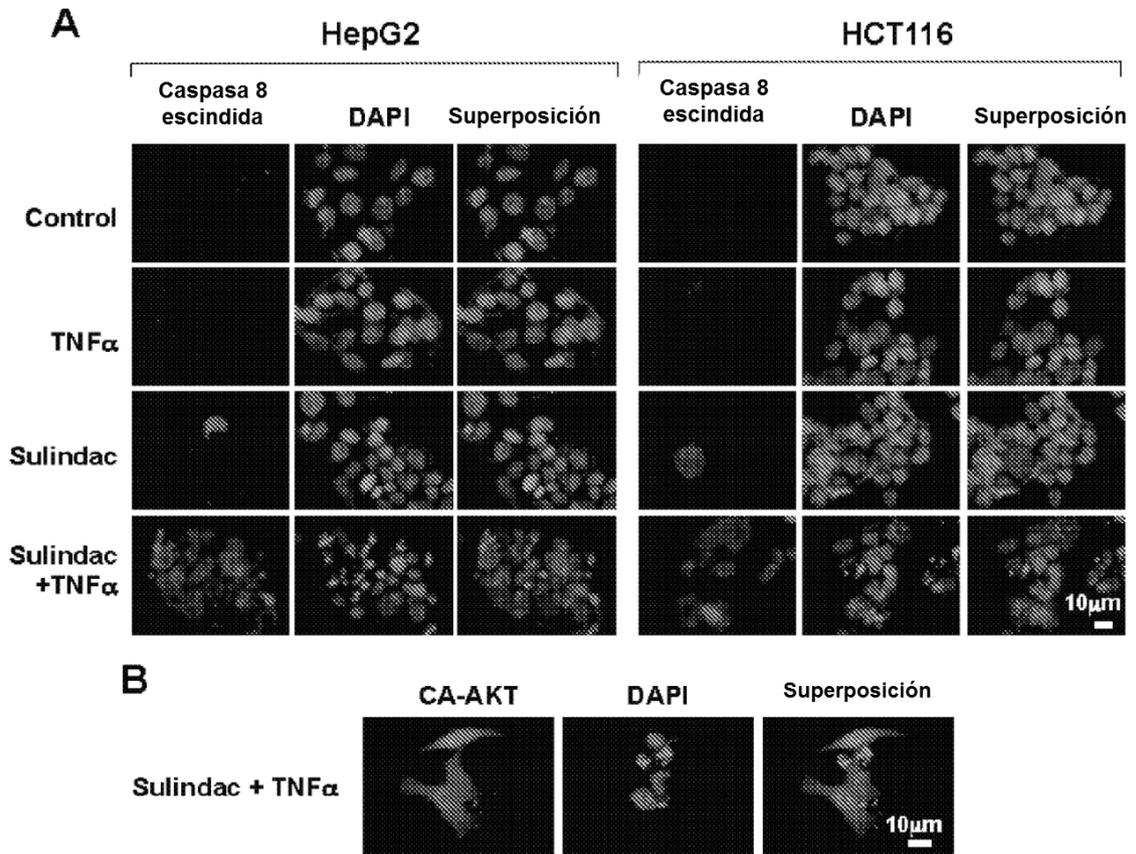


Figura 18

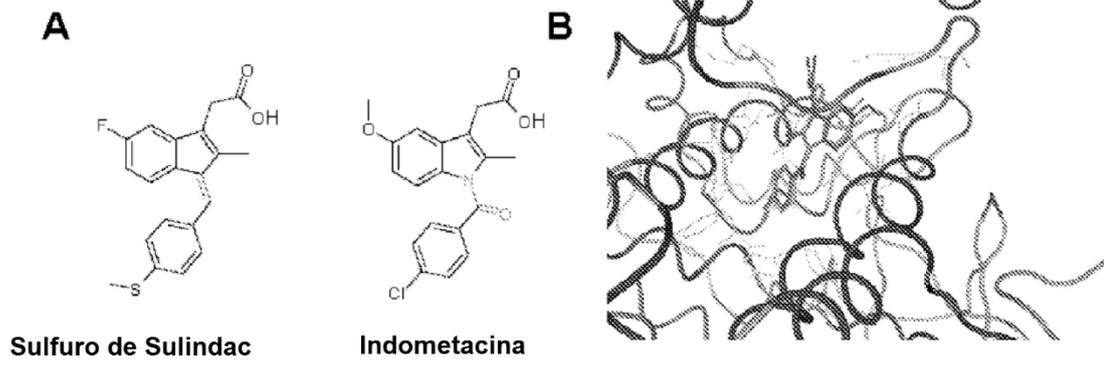


Figura 19

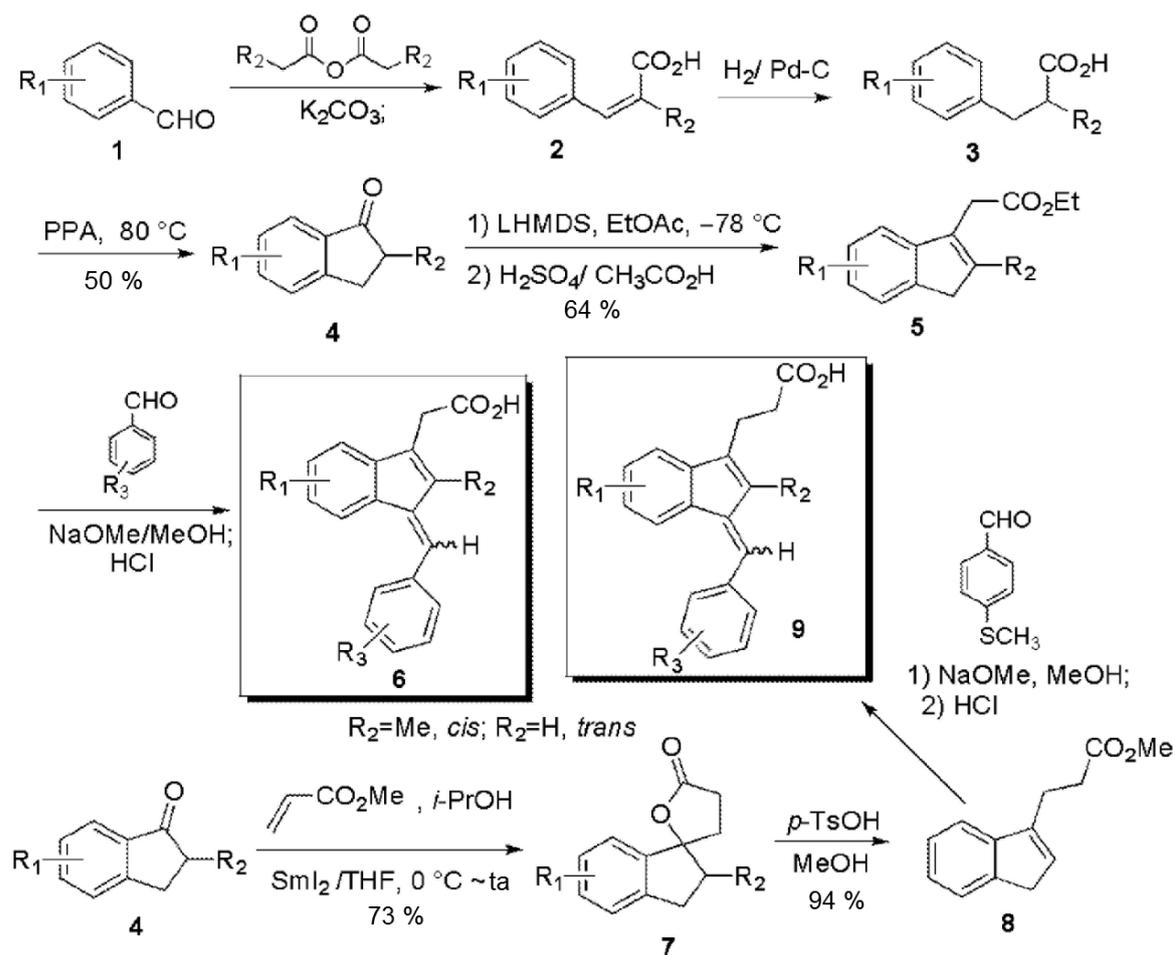


Figura 20

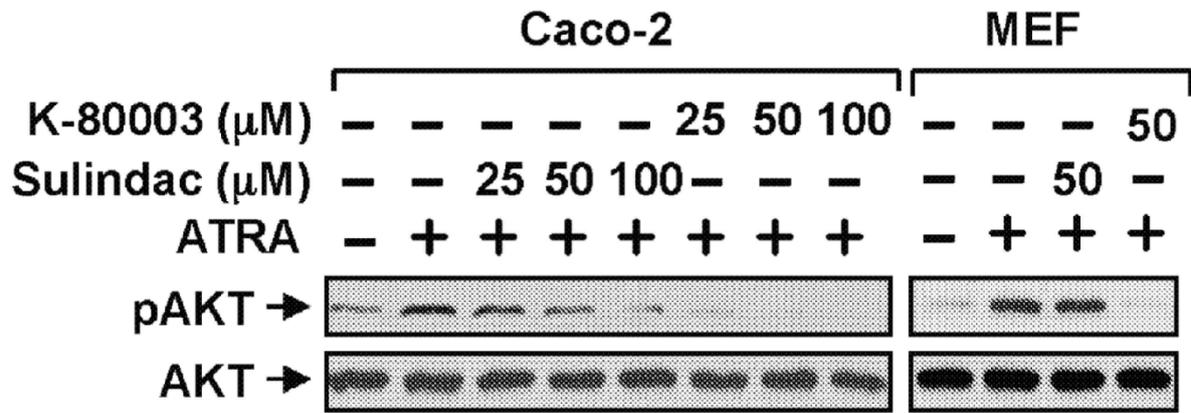


Figura 21

A

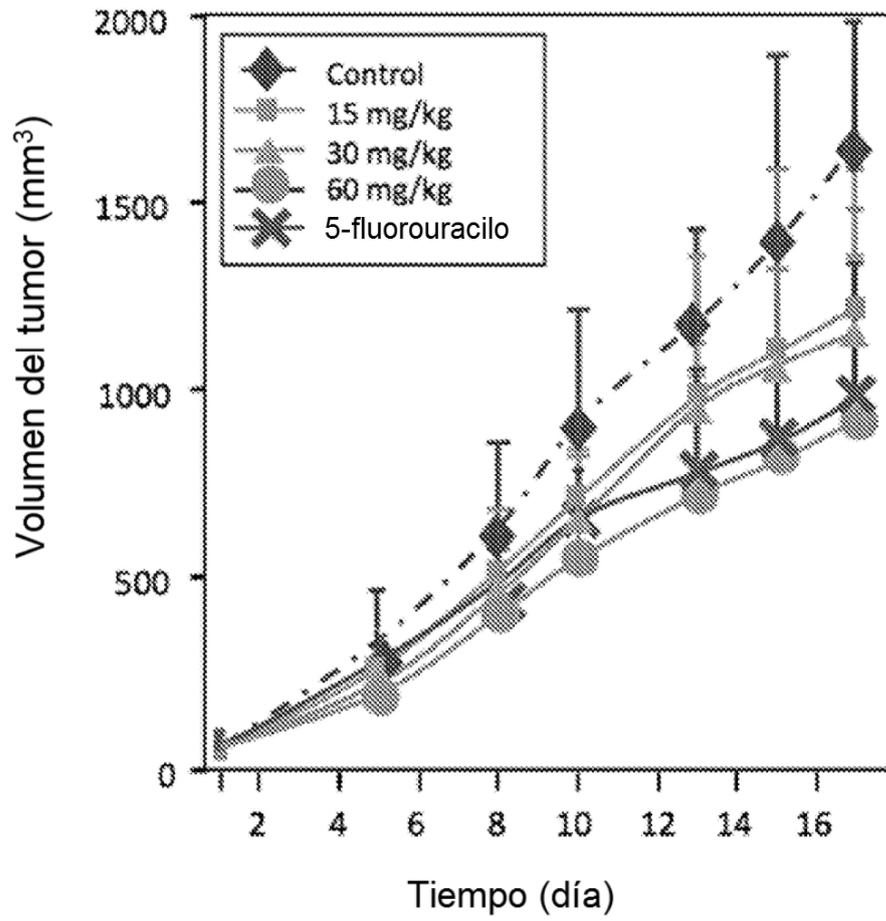
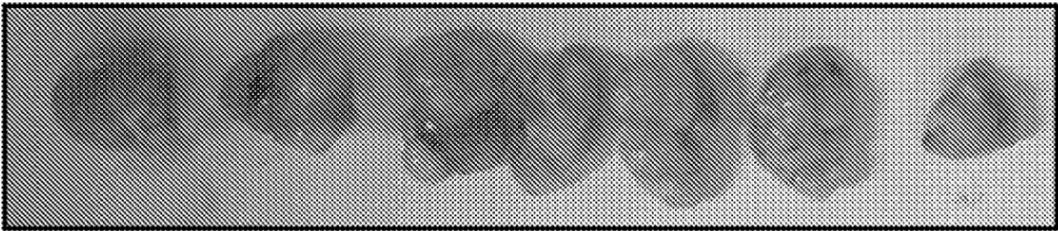


Figura 21 (continuación)

B

Control



C

K-80003

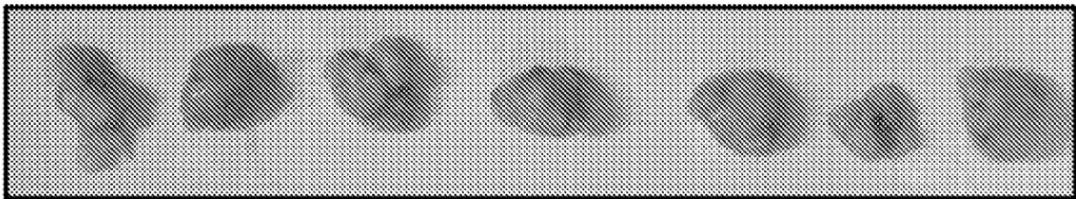
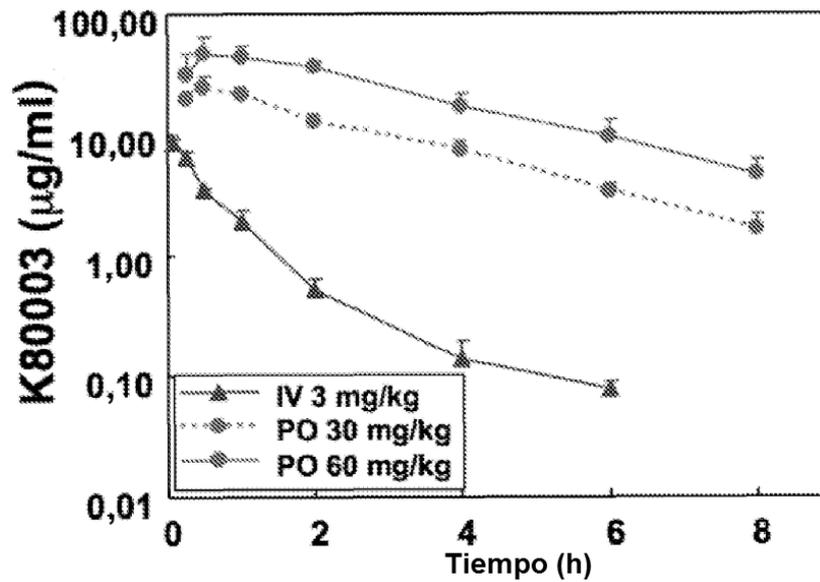


Figura 22

A

Dosis máxima no tóxica (n = 10)	400 mg/kg
Dosis mínima tóxica (n = 10)	450 mg/kg
Dosis mínima letal (1/10)	550 mg/kg
LD50 (n=10)	1,5 g/kg

B



C

Parámetros	Unidad	IV (3 mg/kg)	PO (30 mg/kg)	PO (60 mg/kg)
CL	ml /min/kg	7,3		
Vd	l /kg	0,7		
T1/2	h	1,1	2,0	2,2
ABC(0-t)	µg*h/ml	6,8	72,6	172,4
ABC(0-∞)	µg*h/ml	6,9	77,4	187,9
Cmáx	µg/ml	11,3	24,8	49,0
Tmáx	h		0,5	1,0
F	%		111,6 %	135,5 %