

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 702**

51 Int. Cl.:

C07C 321/20 (2006.01)
C07C 323/12 (2006.01)
C07C 323/60 (2006.01)
C07D 257/04 (2006.01)
C07C 323/66 (2006.01)
C07F 9/54 (2006.01)
A61K 31/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2014 PCT/US2014/000150**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15195071**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2014 E 14895389 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3188726**

54 Título: **Compuestos farmacéuticos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2020

73 Titular/es:
RAFAEL PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1 Duncan Drive
Cranbury, NJ 08512, US

72 Inventor/es:
SHORR, ROBERT;
RODRIGUEZ, ROBERT;
BINGHAM, PAUL;
BOTEJU, LAKMAL;
KWOK, THOMAS y
MARECEK, JAMES

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 747 702 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos farmacéuticos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a agentes farmacéuticos, y más particularmente a agentes terapéuticos que comprenden análogos y derivados novedosos de ácidos grasos de alquilo, tales como, pero sin limitación, ácido lipoico, y formulaciones farmacéuticamente aceptables y procedimientos para el uso de los mismos.

10

Antecedentes de la invención

El mecanismo preciso por el que surge el cáncer continúa siendo objeto de una intensa investigación, y por lo tanto, sigue sin poder alcanzarse una teoría unificadora del origen del cáncer. Investigaciones recientes han confirmado que el cáncer es una enfermedad que surge de las propias células y tejidos del paciente. De hecho, actualmente se sabe que un paciente individual puede poseer múltiples tipos de células tumorales, que pueden no ser las mismas en pacientes con el mismo diagnóstico o incluso en el mismo paciente (siendo la progresión de la enfermedad otro factor añadido). En cualquier caso, la naturaleza altamente individualizada de la enfermedad es un factor importante para impulsar la necesidad de una medicina personalizada. Que 1,2 millones de estadounidenses se diagnostiquen recientemente con cáncer cada año; que 10 millones de estadounidenses vivan con la enfermedad y que el cáncer puede convertirse en la principal causa de muertes relacionadas con una enfermedad hace que el establecimiento de nuevos enfoques de tratamiento sea especialmente urgente.

Se ha observado que la gran mayoría de las células tumorales de crecimiento rápido muestra profundas diferencias genéticas, bioquímicas e histológicas con respecto a las células no transformadas, incluido un metabolismo de energía notablemente modificado en comparación con el tejido de origen. La alteración más notoria y conocida del metabolismo de energía en las células tumorales es un aumento de la capacidad glucolítica incluso en presencia de una concentración de O₂ elevada, un fenómeno conocido como el efecto Warburg. En consecuencia, se cree generalmente que la glucólisis es la principal ruta energética en tumores sólidos. También existe una correlación directa entre la progresión tumoral y las actividades de las enzimas glucolíticas hexoquinasa y fosfofructoquinasa (PFK) 1, que aumentan significativamente en células tumorales de crecimiento rápido. En consecuencia, se ha postulado que las células tumorales que muestran deficiencias en su capacidad oxidativa son más malignas que las que poseen una fosforilación oxidativa activa. Independientemente de si se encuentra en condiciones hipóxicas o aeróbicas, la dependencia del tejido canceroso de la glucólisis se asocia con un aumento de la malignidad.

El complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) se ha asociado con el efecto Warburg. (Véase, por ejemplo, McFate T, Mohyeldin A, Lu H, Thakar J, Henriques J, Halim ND, Wu H, Schell MJ, Tsang TM, Teahan O, Zhou S, Califano JA, Jeoung NH, Harris RA y Verma A (2008). La actividad del complejo piruvato deshidrogenasa controla el fenotipo metabólico y maligno en células cancerosas. *J Biol Chem* 283: 22700-8). La transición al metabolismo de Warburg, por lo tanto, requiere cerrar el complejo PDH. En esta transición, se produce una señalización mejorada por el factor inductor de hipoxia (HIF) en células cancerosas, que a su vez induce la sobreexpresión de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) 1, que es particularmente eficaz para mantener un complejo PDH inactivo. Sin embargo, las alteraciones en PDK1 observadas en el cáncer pueden deberse no solo a cambios en su concentración sino también a cambios en su actividad y posiblemente en su secuencia de aminoácidos, incluso entre un tipo de tumor o de un paciente a otro. Además, el PDK1 puede formar diferentes complejos con diversas moléculas asociadas con tumores dependiendo del tipo de tumor presentado. Estudios recientes sugieren que forzar a las células cancerosas a un metabolismo más aeróbico suprime el crecimiento tumoral. Además, la activación del complejo PDH puede conducir a una producción mejorada de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS), lo que a su vez puede conducir a apoptosis. Por lo tanto, la inhibición de PDK puede ser un objetivo potencial en la generación de apoptosis en tumores. Sin embargo, hasta la fecha, se ha demostrado que los inhibidores de PDK1 conocidos causan una inhibición máxima del 60% de esta isoenzima.

Si bien la quimioterapia tradicional se dirige a las células en proliferación y en división, todos los tratamientos quimioterapéuticos clínicamente aceptados utilizan grandes dosis de fármacos que también inducen un daño profundo a las células huésped proliferativas normales. Por otra parte, el suministro de fármacos a una región hipóxica en tumores sólidos puede ser difícil si el fármaco no penetra fácilmente a través de las diferentes capas celulares. Por lo tanto, se requiere una orientación más selectiva para el tratamiento del cáncer. Otro problema asociado con la quimioterapia es que, en muchos tipos de tumores, se produce una resistencia inherente o adquirida a los fármacos antineoplásicos. En general, la quimioterapia tradicional actualmente ofrece pocos beneficios a largo plazo para la mayor parte de los tumores malignos y a menudo se asocia con efectos secundarios adversos que disminuyen la duración o la calidad de vida.

Por lo tanto, se requieren enfoques nuevos y radicales que puedan proporcionar una gestión a largo plazo de tumores al tiempo que permitan una calidad de vida decente. Para cumplir estos imperativos, sería ventajoso diseñar agentes anticancerígenos que tengan constantes de inhibición metabólica en el intervalo al menos submicromolar. Concentrarse en el efecto Warburg permite diseñar fármacos basados en las diferencias energéticas fisicoquímicas

y bioquímicas entre células tumorales y normales para facilitar el diseño de estrategias de suministro y terapéuticas que afecten selectivamente únicamente al metabolismo y al crecimiento del tumor sin afectar a la función sana del tejido.

5 El ácido lipoico (ácido 6,8-ditiooctanoico) es un antioxidante que contiene azufre con capacidad quelante de metales y anti-glicación. El ácido lipoico es la parte oxidada de un par rédox, capaz de reducirse a ácido dihidrolipoico (DHLA). A diferencia de muchos antioxidantes que son activos solo en los lípidos o en la fase acuosa, el ácido lipoico es activo tanto en fases lipídicas como acuosas. La capacidad antiglicación del ácido lipoico combinada con su capacidad para unirse de forma hidrófoba permite que el ácido lipoico evite la glucosilación de albúmina en el torrente sanguíneo. El ácido lipoico se absorbe fácilmente a partir de la dieta y se convierte rápidamente en DHLA por NADH o NADPH en la mayor parte de los tejidos. Además, tanto el ácido lipoico como el DHLA son antioxidantes capaces de modular las rutas de transducción de señales intracelulares que utilizan RONS como moléculas de señalización.

15 No está claro si el ácido lipoico se produce por células o si es un nutriente esencial, ya que pueden existir diferencias en la concentración intracelular entre tipos de tejido, así como entre células sanas y enfermas o incluso entre individuos dentro de una especie. Las bombas mitocondriales o los mecanismos de absorción, incluidas chaperonas de unión y transporte, pueden ser importantes para transportar ácido lipoico a la mitocondria. Ya se sabe que los niveles de expresión y la estequiometría de las subunidades que comprenden muchas de las enzimas que utilizan el ácido lipoico, que están vinculadas al metabolismo de energía, así como al crecimiento, el desarrollo y la diferenciación, varían con la dieta y el ejercicio, así como con la genética. El papel del ácido lipoico como cofactor en el complejo PDH de células sanas ha sido estudiado a fondo. El complejo PDH tiene un núcleo central de subunidad E2 (dihidrolipoil transacetilasa) rodeado por las subunidades E1 (piruvato deshidrogenasa) y E3 (dihidrolipoil deshidrogenasa) para formar el complejo; los complejos análogos alfa-cetoglutarato deshidrogenasa (α -KDH), acetoina deshidrogenasa (ADH) y alfa-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKADH) también utilizan ácido lipoico como cofactor. En el hueco entre las subunidades E1 y E3, el dominio de lipoílo transporta intermedios entre los sitios activos. El dominio de lipoílo en sí está unido al núcleo E2 por un enlazador flexible. Tras la formación de un hemitioacetil por reacción del piruvato y el pirofosfato de tiamina, este anión ataca el S1 de una especie de lipoato oxidado que se une a un residuo de lisina. En consecuencia, el lipoato S2 se desplaza como un resto sulfuro o sulfhidrilo, y el colapso posterior del hemitioacetil tetraédrico expulsa el tiazol, liberando el cofactor TPP y generando un tioacetato en el S1 del lipoato. En este punto, la funcionalidad lipoato-tioéster se transloca al sitio activo E2, en el que una reacción de transacilación transfiere el acetilo del "brazo basculante" del lipoato al tiol de la coenzima A. Esto produce acetil-CoA, que se libera del complejo enzimático y subsiguientemente penetra en el ciclo TCA. El dihidrolipoato, aún unido a un residuo de lisina del complejo, migra después al sitio activo E3, en el que experimenta una oxidación mediada por flavina de nuevo a su estado de reposo de lipoato, produciendo FADH₂ (y en último término NADH) y regenerando el lipoato de nuevo en un aceptor de acilo competente.

Las patentes de Estados Unidos N^o 6.331.559 y 6.951.887 por Bingham *et al.*, así como la solicitud de patente de Estados Unidos N^o 2008/0262034 por Bingham *et al.*, divulgan una nueva clase de agentes terapéuticos derivados de ácido lipoico que se dirigen selectivamente y destruyen tanto células tumorales como otros determinados tipos de células enfermas a través de enzimas y complejos de múltiples enzimas específicas de la enfermedad. Estas patentes divulgan además composiciones farmacéuticas, y procedimientos de uso de las mismas, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de dichos derivados de ácido lipoico junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para los mismos.

El documento WO 2011/046583 divulga un agente farmacéuticamente aceptable que muestra la reducción de peroxidasa (Prx) y sus isoformas, y sus formas mutantes, selectivamente en una célula enferma de un animal de sangre caliente, que conduce a la muerte celular.

El documento US2012/0178812 divulga una formulación farmacéutica que comprende al menos un derivado de ácido lipoico, al menos un agente de apareamiento de iones de amina terciaria y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los presentes inventores han descubierto análogos y derivados adicionales más allá del alcance de las patentes antes mencionadas.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un análogo o derivado de un ácido graso de alquilo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

En una forma de realización adicional de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un análogo o derivado de ácido graso de alquilo tal como se describe en el presente documento se combina con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una formulación farmacéutica útil para el tratamiento, la prevención, la obtención de imágenes o el diagnóstico de una enfermedad de animales de sangre caliente, incluidos seres humanos, siendo las células o tejidos enfermos sensibles a dichos análogos o derivados de

ácidos grasos de alquilo. El, al menos un, análogo o derivado de ácido graso de alquilo está presente en una cantidad de aproximadamente 0,001 mg/m² a unos 10 g/m². Adicionalmente, como cualquiera o todos estos análogos o derivados pueden metabolizarse dentro de la célula enferma, o mitocondrias u otros orgánulos de la misma, se pretende expresamente que los metabolitos de los análogos o derivados mencionados anteriormente se encuentren dentro del alcance de la presente invención. Además, en cada una de las fórmulas generales, el isómero (R) de cada compuesto particular posee mayor actividad fisiológica que el isómero (S). En consecuencia, el, al menos un, análogo o derivado deberá administrarse únicamente en forma de isómero (R) o en una mezcla de los isómeros (R) y (S).

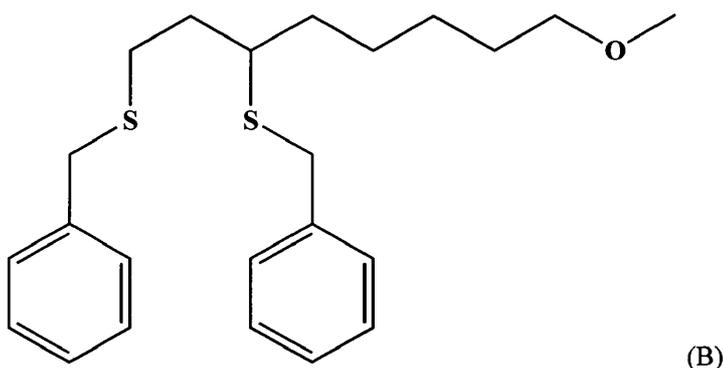
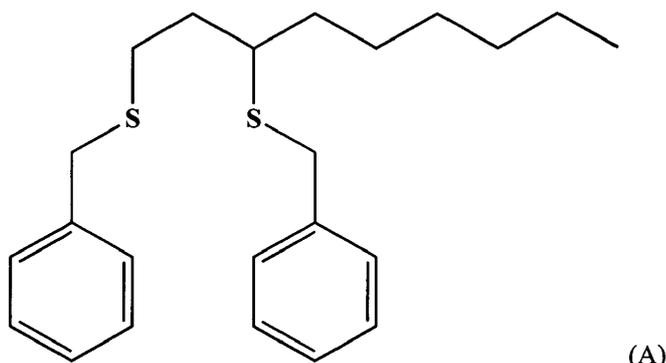
5 En otra forma de realización adicional de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para tratar, prevenir, obtener imágenes o diagnosticar una enfermedad caracterizada por células o tejidos de animales de sangre caliente, incluidos seres humanos, que son sensibles a la administración de un análogo o derivado de ácido graso de alquilo tal como se describe en el presente documento, que comprende administrar a un paciente con necesidad de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un análogo o derivado de ácido graso de alquilo según cualquiera de las formas de realización de la invención. En una forma de realización preferida, el, al menos un, análogo o derivado de ácido graso de alquilo se combina con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una formulación farmacéutica.

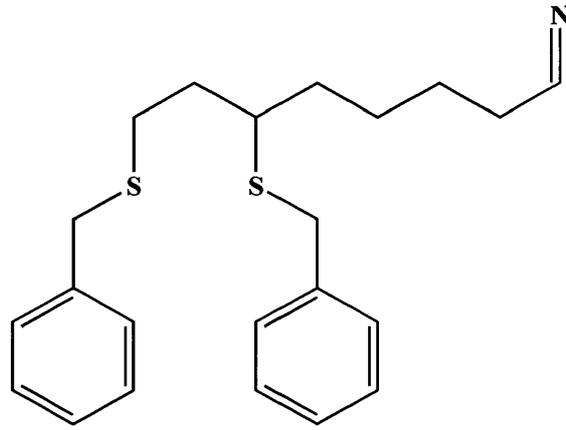
20 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a nuevos análogos o derivados de un ácido graso de alquilo.

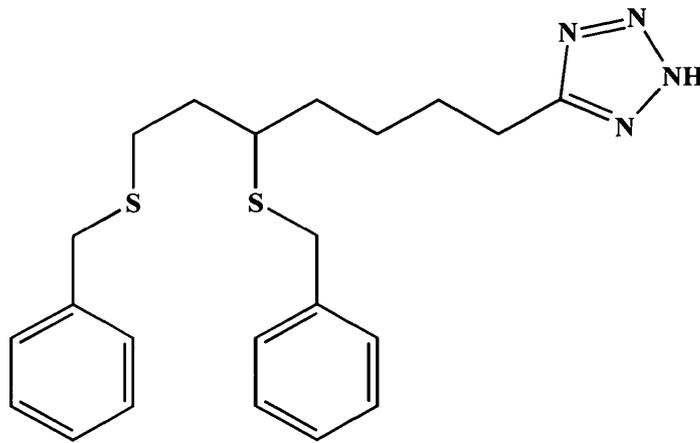
Los análogos o derivados de ácidos grasos de alquilo particulares incluyen:

25

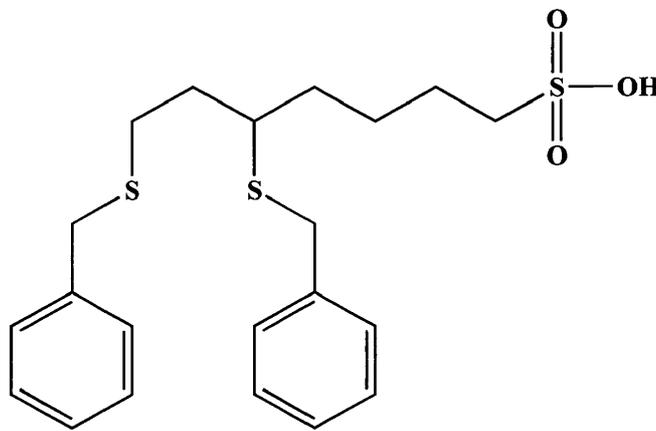




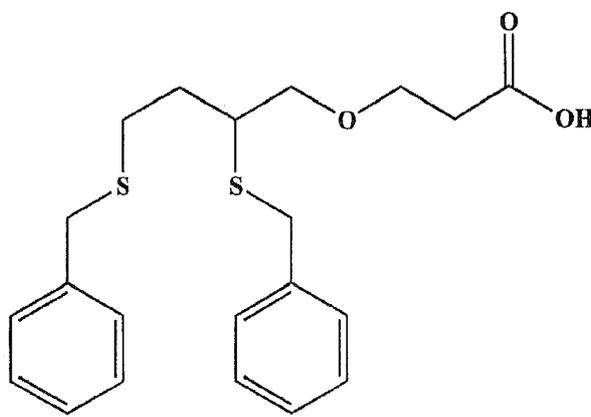
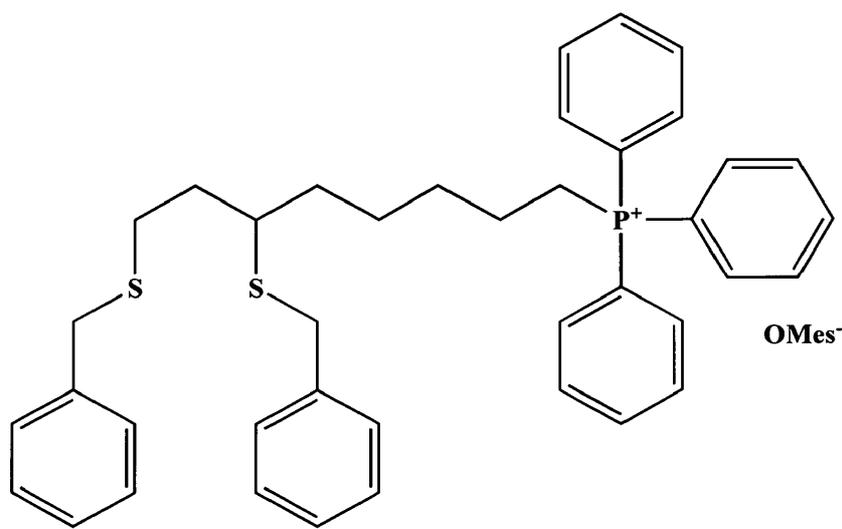
(C)



(D)



(E)



5 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un análogo o derivado de ácido graso de alquilo de cualquiera de las formas de realización mencionadas anteriormente se puede administrar a un sujeto para el tratamiento, la prevención, el diagnóstico y/o la obtención de imágenes de una enfermedad, o síntomas de la misma, en animales de sangre caliente. Alternativamente, en otra forma de realización de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un análogo o derivado de ácido graso de alquilo de una cualquiera de las formas de realización mencionadas anteriormente se combina con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una formulación farmacéutica útil para el tratamiento, la prevención, el diagnóstico y/o la obtención de imágenes de una enfermedad, o síntomas de la misma, en animales de sangre caliente. Dichos animales incluyen los de la clase de los mamíferos, tales como seres humanos, caballos, ganado vacuno, animales domésticos, incluidos perros y gatos, y similares. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen aquellos utilizados convencionalmente en composiciones farmacéuticas, tales como, pero sin limitación, disolventes, diluyentes, tensioactivos, solubilizantes, sales, antioxidantes, tampones, agentes quelantes, saborizantes, colorantes, conservantes, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, agentes antimicrobianos y combinaciones de los mismos, opcionalmente en combinación con otros ingredientes terapéuticos. Cuando se utilizan en medicina, las sales deberán ser farmacéuticamente aceptables, pero pueden utilizarse sales no farmacéuticamente aceptables de forma conveniente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no están excluidas del alcance de la invención. Dichas sales farmacológicamente y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, las preparadas a partir de los ácidos siguientes: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, palicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden prepararse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo ácido carboxílico.

30 Los disolventes particularmente adecuados para su uso en la presente invención incluyen alcohol bencílico, dimetilamina, alcohol isopropílico y combinaciones de los mismos; un experto en la técnica reconocerá fácilmente que puede ser deseable disolver en primer lugar al menos un derivado de ácido lipoico en un disolvente adecuado y después diluir la solución con un diluyente.

Cuando se desee una formulación farmacéutica adecuada para la administración intravenosa, se empleará un diluyente adecuado. Cualquier disolvente aprótico acuoso o polar convencional es adecuado para su uso en la presente invención. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, sin limitación, solución salina, una solución de azúcar, alcoholes tales como alcohol etílico, metanol y alcohol isopropílico, disolventes apróticos polares tales como dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilacetamida (DMA), y combinaciones de los mismos. Un diluyente farmacéuticamente aceptable preferido es una solución de dextrosa, de forma más preferida una solución de dextrosa que contiene de aproximadamente el 2,5% a aproximadamente el 10%, de forma más preferida de aproximadamente el 5%, de dextrosa en peso. El diluyente farmacéuticamente aceptable se emplea normalmente en una cantidad que no genera homólisis; un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad de diluyente adecuada para su uso en una formulación farmacéutica según la presente invención.

Tal como se utiliza en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la dosificación o la dosificación múltiples del análogo o derivado de ácido graso de alquilo en el que se logra el efecto deseado. En general, una cantidad eficaz del análogo o derivado puede variar con la actividad del agente específico empleado; la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese agente; la especie, edad, peso corporal, salud general, estado alimenticio, sexo y dieta del sujeto; el modo y el tiempo de administración; tasa de excreción; combinación de fármacos, si se da el caso; y extensión de la presentación y/o gravedad de la afección particular que se está tratando. La dosificación precisa puede determinarse por parte de un experto en la técnica sin una experimentación excesiva, en una o varias administraciones por día, para obtener los resultados deseados, y la dosis puede ajustarse por parte del profesional individual para lograr un efecto deseado o en caso de alguna complicación.

El análogo o derivado de ácido graso de alquilo de la presente invención puede administrarse por cualquier medio, en cualquier cantidad deseada hasta la cantidad máxima que puede administrarse de forma segura a un paciente. La cantidad del análogo o derivado puede variar de menos de 0,01 mg/ml a más de 1000 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 50 mg/ml.

En general, el análogo o derivado de ácido graso de alquilo de la presente invención se administrará de forma suficiente para suministrar al paciente una cantidad eficaz para suministrar el agente a su objetivo molecular deseado. La cantidad de dosificación puede variar de aproximadamente 0,001 mg/m² a aproximadamente de 10 g/m², preferentemente de aproximadamente 60 mg/m². La cantidad de dosificación se puede administrar en una dosis única o en forma de dosis individuales divididas, tal como de una a cuatro o más veces por día. En caso de que la respuesta en un sujeto sea insuficiente a una dosis determinada, se pueden emplear dosis aún más elevadas (o dosis más elevadas eficaces por una vía de administración diferente y más localizada) en el grado de tolerancia del paciente.

Como cualquiera o la totalidad de estos análogos o derivados puede metabolizarse dentro de la célula enferma, o mitocondrias u otros orgánulos de la misma, tras la administración al paciente, se pretende expresamente que los metabolitos de los análogos o derivados mencionados anteriormente se encuentren dentro del alcance del presente invención. Además, en cada una de las fórmulas generales, el isómero (R) de cada compuesto particular posee mayor actividad fisiológica que el isómero (S). En consecuencia, el, al menos un, análogo o derivado debe administrarse únicamente en forma de isómero (R) o en una mezcla de los isómeros (R) y (S).

La formulación farmacéutica de la presente invención puede prepararse según técnicas de formulación convencionales y puede adoptar cualquier forma farmacéutica que pueda reconocer el experto en la técnica como adecuada. Las formas farmacéuticas adecuadas incluyen formulaciones sólidas, semisólidas, líquidas o liofilizadas, tales como comprimidos, polvos, cápsulas, supositorios, suspensiones, liposomas, emulsiones, nanoemulsiones, aerosoles, pulverizaciones, geles, lociones, cremas, pomadas y similares. Si se desea dicha formulación, se pueden incluir otros aditivos bien conocidos en la técnica para impartir la consistencia deseada y otras propiedades a la formulación. Por ejemplo, una solución madre del, al menos un, análogo o derivado de ácido graso de alquilo puede prepararse según técnicas convencionales y después diluirse según se desee mediante un diluyente farmacéuticamente aceptable para formar una preparación líquida tal como una solución de uso parenteral estéril.

La formulación farmacéutica de la presente invención puede administrarse utilizando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable y que produzca niveles eficaces del agente sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Aunque se prefieren formulaciones específicamente adecuadas para la administración parenteral, la formulación farmacéutica de la presente invención puede estar contenida en cualquier recipiente adecuado, tal como un vial o una ampolla, y adecuado para su administración por una de varias vías, incluidas metodologías o administración por inhalación, oral, tópica, transdérmica, nasal, ocular, pulmonar, rectal, transmucosal, intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intratorácica, intrapleural, intrauterina, intratumoral o por infusión, sin limitación. Los expertos en la técnica reconocerán que el modo de administración del análogo o derivado de la presente invención depende del tipo de enfermedad o síntoma que se desea tratar. Asimismo, los expertos en la técnica también reconocerán que los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables particulares variarán de entre las formulaciones farmacéuticas adecuadas para un modo de administración a las adecuadas para otro modo de administración.

En una forma de realización adicional de la presente divulgación, se proporciona un procedimiento para tratar, prevenir, obtener imágenes y/o diagnosticar una enfermedad caracterizada por células o tejidos enfermos que son sensibles a análogos o derivados de ácidos grasos de alquilo según la presente invención, que comprende administrar a un paciente con necesidad de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de dichos análogos o derivados. En una forma de realización preferida, el, al menos un, análogo o derivado de ácido graso de alquilo se incorpora en una formulación farmacéutica según la presente invención.

Los análogos o derivados de ácidos grasos de alquilo de la presente invención, y las formulaciones farmacéuticas de los mismos, pueden utilizarse para tratar, prevenir, diagnosticar u obtener imágenes de enfermedades que implican actividad celular compleja de PDH, α -KDH, ADH y/o BCKADH distinta o alterada. Las células con actividad alterada o perturbada de PDH, α -KDH, ADH y/o BCKADH es un objetivo particular, de forma que, tras la administración, el análogo o derivado de la presente invención se administra selectivamente y es absorbido por una masa tumoral y las células transformadas dentro de la misma, y se concentra eficazmente dentro de las mitocondrias de esas células, evitando así que las células y los tejidos sanos sufran los efectos del análogo o derivado. Por lo tanto, el agente de la presente invención es particularmente adecuado para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por hiperproliferación celular. El experto en la técnica puede identificar fácilmente las enfermedades que presentan dicha actividad o, alternativamente, puede cribar fácilmente la enfermedad de interés por su sensibilidad a dichos análogos o derivados.

Se espera que los análogos o derivados de ácidos grasos de alquilo de la presente invención, y sus formulaciones farmacéuticas, sean útiles en tipos de cáncer generales tales como carcinoma, sarcoma, linfoma y leucemia, tumor de células germinales y blastoma. Más específicamente, se espera que la composición farmacéutica de la presente invención sea útil en melanoma primario o metastásico, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma de Hodgkin y no de Hodgkin, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de colon y adenocarcinomas tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de páncreas, sin limitación. Los ejemplos no limitantes de otras enfermedades caracterizadas por hiperproliferación celular susceptibles al agente de la presente invención incluyen la degeneración macular relacionada con la edad; la enfermedad de Crohn; cirrosis; trastornos crónicos relacionados con la inflamación; retinopatía o neuropatía diabética; granulomatosis; hiperproliferación inmunológica asociada con trasplante de órganos o tejidos; una enfermedad o trastorno inmunoproliferativo (por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico); hiperproliferación vascular secundaria a hipoxia retiniana; o vasculitis

Adaptando los procedimientos descritos en el presente documento, los análogos o derivados de ácidos grasos de alquilo de la presente invención, y las formulaciones farmacéuticas de los mismos, también pueden utilizarse en el tratamiento, la prevención, la obtención de imágenes o el diagnóstico de enfermedades distintas de las caracterizadas por hiperproliferación celular. Por ejemplo, los patógenos eucariotas de humanos y otros animales son generalmente mucho más difíciles de tratar que los patógenos bacterianos porque las células eucariotas son mucho más similares a las células animales que las células bacterianas. Dichos patógenos eucariotas incluyen protozoos tales como los que causan malaria, así como hongos y algas patógenos. Debido a la notable falta de toxicidad de los análogos o derivados de ácidos grasos de alquilo de la presente invención con respecto a células humanas y animales no transformadas, y porque es probable que muchos patógenos eucariotas pasen por etapas del ciclo de vida en las que sus complejos PDH, α -KDH, ADH y/o BCKADH se vuelven sensibles a dichos análogos o derivados, los análogos o derivados de ácidos grasos de alquilo de la presente invención, y las formulaciones farmacéuticas de los mismos, pueden utilizarse como agentes bactericidas.

Las formas de realización específicas de la invención se demostrarán ahora con referencia a los ejemplos siguientes. Debe entenderse que estos ejemplos se divulgan únicamente a modo de ilustración de la invención y no deben considerarse de ninguna forma limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Cribado de análogos para la actividad de destruir células en células cancerosas

Objetivo

El objetivo de esta investigación fue evaluar las actividades *in vitro* de destrucción celular de análogos de ácido lipoico en células pancreáticas humanas BXP3, células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas H460 y células cancerosas de gliosarcoma humano SF539.

Materiales y procedimientos

Materiales

Todos los materiales se obtuvieron a través de los canales de distribución normales del fabricante indicado.

Placa de paredes opacas Costar, Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, N° de cat. 3917, N° de cat. de Fisher Scientific 07-200-628

5 FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Offenburg, Alemania

Ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter Glo® (CTG), Promega, Fisher Scientific N° de cat. PR-G7573

Medio de cultivo de tejidos RPMI 1640, Mediatech, Fisher Scientific N° de cat. MT-10040-CV

10 Suero bovino fetal (FBS), N° de cat. de Fisher Scientific MTT35011CV

Penicilina y esteptomycinina, N° de cat. de Fisher Scientific MT 30-009-CI

15 *Líneas celulares tumorales*

En esta investigación se utilizaron tres tipos de células tumorales humanas, cáncer pancreático humano BXPC3, carcinoma de pulmón de células no pequeñas H460 y gliosarcoma humano SF539. Las células BXPC3 y H460 se obtuvieron originariamente de American Type Cell Culture (ATCC). Las células SF539 se obtuvieron originalmente del NCI AIDS and Cancer Specimen Bank (ACSB). Todas las células tumorales se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% humidificada en matraces de cultivo de tejidos T75 que contenían 20 ml de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 que contenía L-glutamina 2 mM, 10% de FBS y el 1% de penicilina y estreptomycinina (100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycinina). Las células tumorales se dividieron en una proporción de 1:5 cada 4-5 días por tripsinización y se resuspendieron en medio nuevo en un matraz nuevo. Las células se recogieron para experimentos al 70-90% de confluencia.

25 *Artículos de ensayo*

Se prepararon soluciones madre de cada análogo a una concentración de 200 y 100 mM en DMSO. Se diluyeron cinco µl de esta solución en 10,0 ml de medio RPMI que contenía suero al 0,5% para dar las soluciones deseadas de 100 µM y 50 µM en DMSO al 0,05%.

30 Procedimientos de estudio

35 *Diseño del estudio*

Las células cancerosas se sembraron a 4000 células/pocillo para células H460 y 6000 células/pocillo para células BXPC3 y SF 539 y se incubaron durante 24 horas. La actividad destructora de los análogos se analizó a concentraciones de 50 µM y 100 µM. Las células tumorales se trataron durante 24 horas con el artículo de ensayo, y después de 24 horas de tratamiento se determinó el número de células tumorales viables utilizando el ensayo CTG.

40 *Siembra de células para experimentos*

Las células se cultivaron hasta un 70-90% de confluencia, se eliminó el medio y las monocapas celulares se lavaron brevemente mediante la adición de 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), operación seguida de aspiración. Se añadió tripsina-ácido de etilendiaminotetraacético (EDTA) (4 ml) a cada matraz, y el matraz se dispuso en la incubadora de cultivo de tejidos durante 5 minutos. Se añadió medio que contenía suero (10 ml) para detener las reacciones enzimáticas, y las células se disgregaron por resuspensión repetida con pipeta serológica. El medio que contenía células (20 µl) se añadió a 20 µl de solución de azul de tripano al 0,4%, se mezcló, y se dispusieron 10 µl de esta mezcla que contenía células en una cámara del hemocitómetro. El número de células viables se determinó contando el número de células viables (células que excluyeron el azul de tripano) en los cuatro cuadrados de las esquinas de la cámara del hemocitómetro con un aumento de 100x, para obtener el número promedio de células presentes. El volumen de células necesarias se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen de células necesario.....} = \frac{\text{Nº de células necesarias para el ensayo (ml)}}{\text{Nº de células contadas (ml)}}$$

55 en la que Nº de células contadas (ml) = Nº promedio de células en hemocitómetro x 2 (factor de dilución) x 10⁴.

El número de células objetivo del estudio es de 4 x 10³ por pocillo para células H460 y 6x10³ por pocillo para células BXPC3 y SF539 en 100 µl de medio. Se contó el número real de células y se sembraron en los pocillos de una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron durante aproximadamente 24 horas antes de la adición del artículo de ensayo.

Tratamiento con artículo de ensayo

5 Los medios en la placa se eliminaron por aspiración, y se añadieron a las células 100 µl del artículo de ensayo a una concentración final 50 µM o 100 µM. Después de la exposición a los artículos de ensayo durante 24 horas, se determinó el número de células viables en cada pocillo y se calculó el porcentaje de células viables con respecto al control (en ausencia del artículo de ensayo). Adicionalmente, se trató una serie de pocillos con medio de cultivo celular en ausencia de células para obtener un valor para la luminiscencia de fondo. Se sembró una serie aparte de células al mismo tiempo en una placa transparente de 96 pocillos y se observó bajo el microscopio a las 24 horas, tras la adición del artículo de ensayo para estimar la cantidad de células presentes después del tratamiento.

Determinación del número de células viables mediante el ensayo CTG

15 El número de células viables se determinó utilizando el ensayo CTG. Específicamente, los reactivos se mezclaron y se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente según las instrucciones de Promega, Inc. (Madison, WI). Las placas celulares se retiraron de la incubadora de cultivo celular y se dejaron en el banco durante treinta minutos hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl por pocillo de reactivo CTG con la pipeta Eppendorf de 12 canales. Las células se lisaron agitando la placa durante dos minutos en un agitador. Las células se mantuvieron a temperatura ambiente durante diez minutos para estabilizar la señal luminiscente. La luminiscencia se midió utilizando el lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Inc., Durham, NC).

Cálculo de la actividad de destrucción de células

25 Los datos de las lecturas de luminiscencia se copiaron en hojas de cálculo EXCEL y se calculó el crecimiento celular con respecto a las células no tratadas utilizando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ de crecimiento con respecto a NT} = \frac{\text{luminiscencia media del artículo de ensayo}}{\text{luminiscencia media de no tratadas}} \times 100\%$$

Resultados y conclusiones

30 Los resultados del experimento se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Comparación de la actividad de destrucción de células cancerosas *in vitro* de análogos de la presente invención

Artículo	% de células viables remanente (0,5% de suero y 0,05% de DMSO)					
	BXPC3		H460		SF539	
	% promedio de células vivas a 50 µM	% promedio de células vivas a 100 µM	% promedio de células vivas a 50 µM	% promedio de células vivas a 100 µM	% promedio de células vivas a 50 µM	% promedio de células vivas a 100 µM
A	84,0	75,0	89,0	70,0	100,0	98,0
B	84,0	91,0	97,0	67,0	99,0	99,0
C	70,9	36,1	69,8	27,1	74,9	23,2
D	0,3	3,9	4,1	2,7	2,1	0,1
E	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0
F	2,0	3,9	2,4	4,0	0,0	0,0
G	99,7	41,7	101,7	37,6	91,6	30,3

40 Como se evidencia a partir de la Tabla 1, cada uno de los análogos de la presente invención demostró una actividad de destrucción celular *in vitro* contra al menos una de las líneas celulares cancerosas sometidas a ensayo a una concentración de 50 µM, una concentración de 100 µM o ambas.

La discusión anterior divulga y describe formas de realización meramente ejemplares de la presente invención. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente a partir de dicha discusión, y a partir de las reivindicaciones adjuntas, que se pueden realizar diversos cambios, modificaciones y variaciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones siguientes. Además, aunque en el presente documento se han expresado

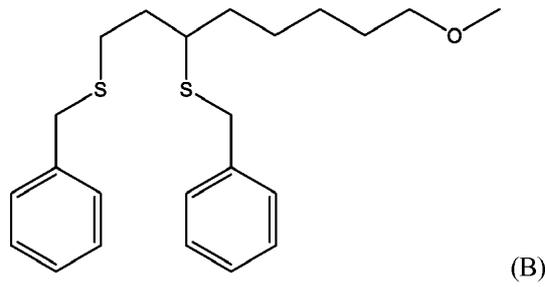
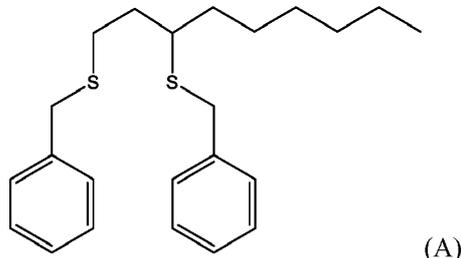
formas de realización ejemplares, otros expertos en la técnica pueden conocer otros diseños o usos de la presente invención. Por lo tanto, aunque la presente invención se ha descrito con respecto a formas de realización ejemplares de la misma, se entenderá que muchas modificaciones tanto en el diseño como en el uso serán evidentes para los expertos en la técnica. Por lo tanto, se pretende manifiestamente que la presente invención esté limitada únicamente por las reivindicaciones.

5

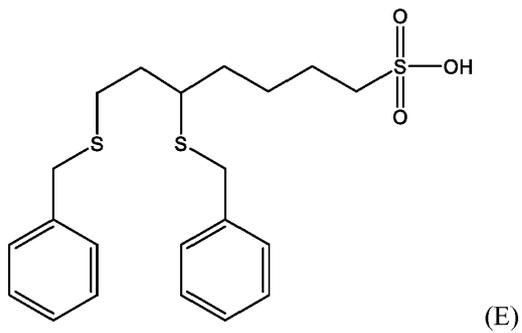
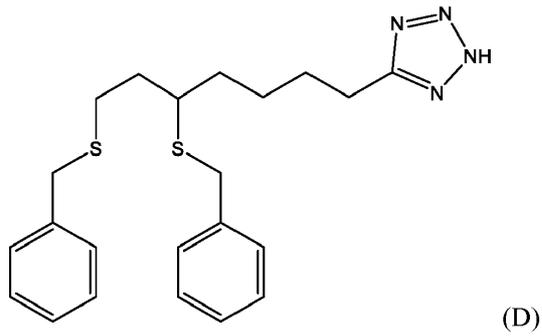
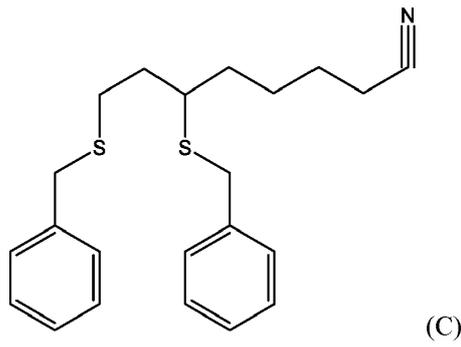
REIVINDICACIONES

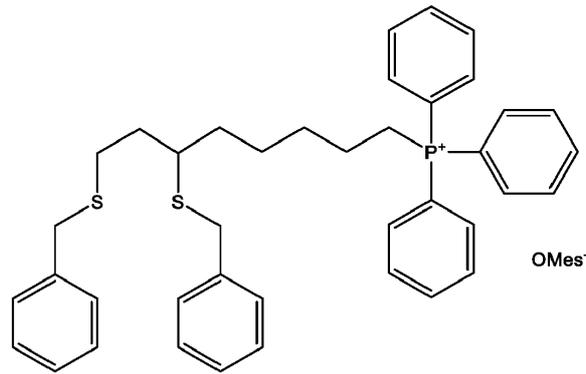
1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

5

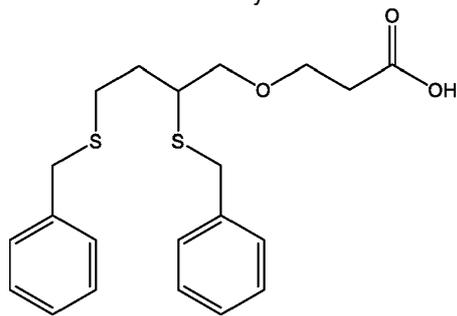


10



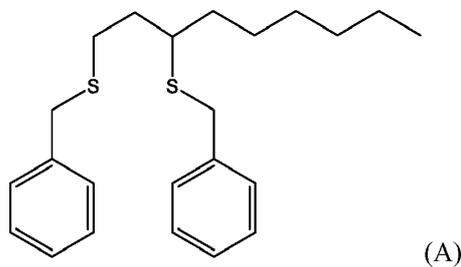


y

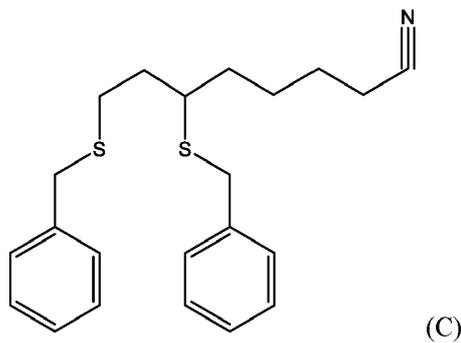
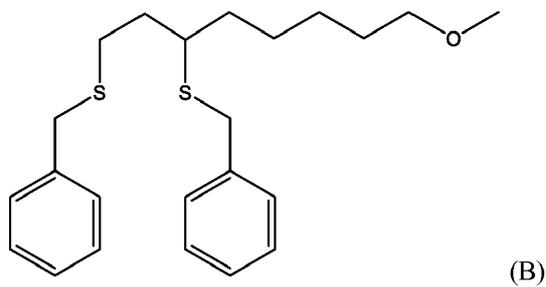


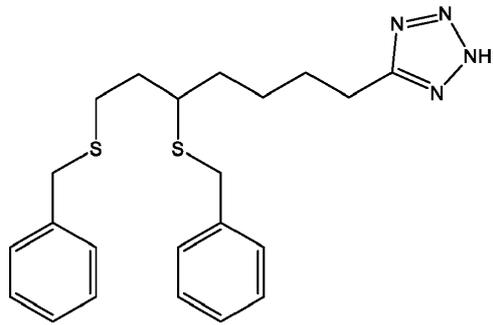
5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, siendo el compuesto

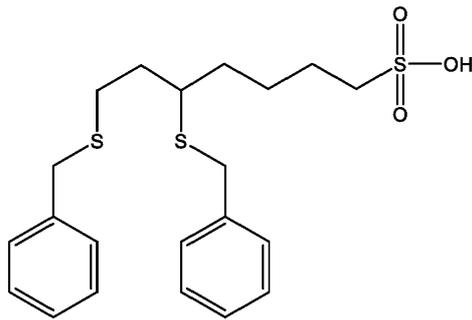


10



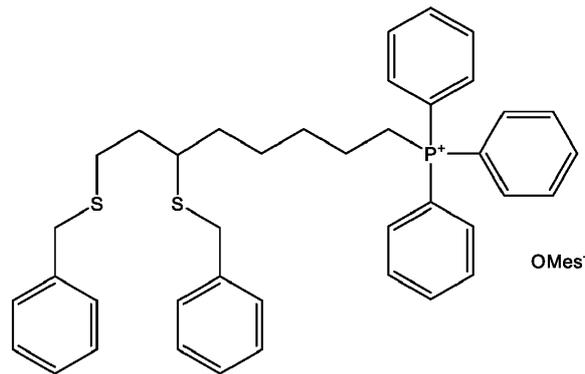


(D)

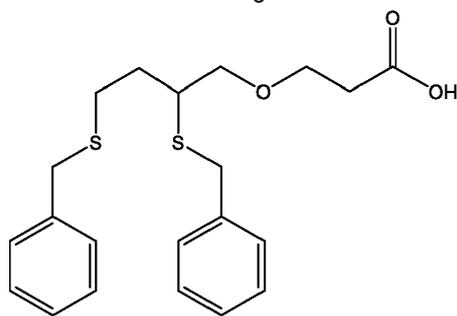


(E)

5

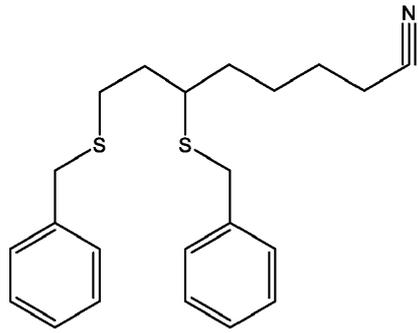


(F)



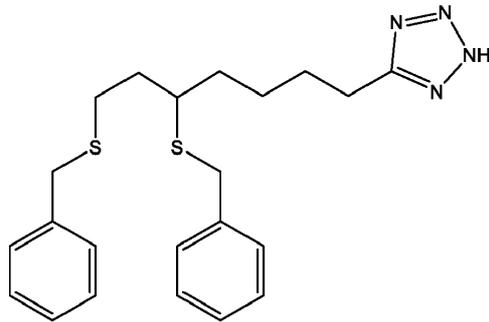
(G).

10 3. Un compuesto de la reivindicación 1, siendo el compuesto



(C).

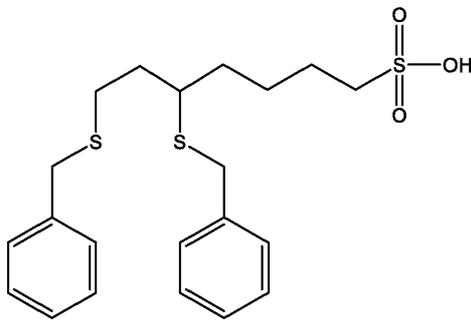
4. Un compuesto de la reivindicación 1, siendo el compuesto



(D).

5

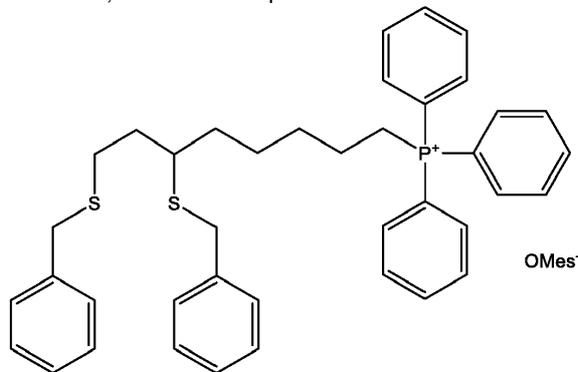
5. Un compuesto de la reivindicación 1, siendo el compuesto



(E).

10

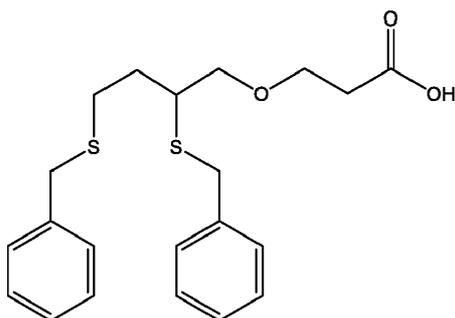
6. Un compuesto de la reivindicación 1, siendo el compuesto



(F).

7. Un compuesto de la reivindicación 1, siendo el compuesto

15



(G).

- 5 8. Una formulación farmacéutica que comprende al menos un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la formulación farmacéutica de la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 10 10. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la formulación farmacéutica de la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de un carcinoma, un sarcoma, un linfoma, leucemia, un tumor de células germinales o un blastoma.
- 15 11. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la formulación farmacéutica de la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de un melanoma primario, un melanoma metastásico, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, un linfoma de Hodgkin, un linfoma no de Hodgkin, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario o cáncer de páncreas.