

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 598**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2013** **E 17162895 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019** **EP 3202397**

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

30 Prioridad:

**06.08.2012 AU 2012903365**

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

**29.04.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

**ES 2 757 598 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

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

## Campo técnico

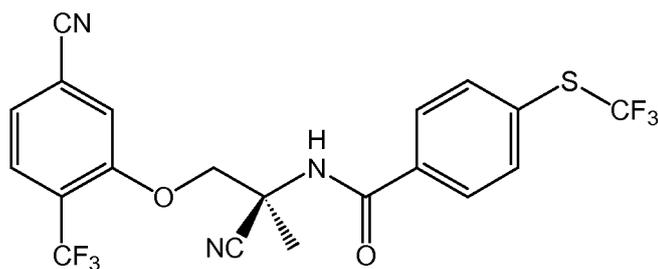
5 En general, la presente invención se refiere a los compuestos para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la vía mTOR (blanco mamífero de la rapamicina). Específicamente, la presente invención se refiere al uso de derivados de amino acetonitrilo (AAD) en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la vía mTOR.

## Técnica anterior

10 Los derivados de amino acetonitrilo (AAD) son una clase de antihelmínticos eficaces contra los nematodos resistentes al medicamento. Los nematodos, o ascárides, comprenden un gran número de patógenos de seres humanos y animales domésticos. Los nematodos gastrointestinales, como por ej., *Haemonchus contortus*, son parásitos importantes de los rumiantes que originan pérdidas económicas sustanciales a la producción ganadera en todo el mundo.

15 Monepantel (MPL) (N-[(1S)-1-Ciano-2-(5-ciano-2-trifluorometil-fenoxi)-1-metil-etil]-4-trifluorometil- sulfanil-benzamida) es un ejemplo de este tipo de AAD y ha sido aprobado como un nematocida para el tratamiento de parásitos gastrointestinales en ovejas.

15



20

MPL

25

El MPL ha mostrado ser eficaz contra varias especies de nematodos patogénicos del ganado.

30 Como nematocida, el mecanismo de acción del MPL es a través de los canales iónicos activados por ligandos que provocan la interferencia de la transducción de señal en la sinapsa neuromuscular. Los parásitos afectados experimentarán la desregulación en la contracción muscular, la parálisis, la necrosis y en los defectos de muda. Tres genes relacionados con el receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) han sido identificados como los blancos primarios del MPL y los tres genes codifican las proteínas que representan la subfamilia DEG-3 de las subunidades nAChR que solo están presentes en los nematodos. El gen DEG-3 codifica una subunidad  $\alpha$  nAChR la cual se asemeja a la de la subunidad  $\alpha 7$  en el segundo dominio de transmembrana.

35 Ducray P. et al. (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Pergamon, Amsterdam, NL, vol. 18, no. 9, Mayo 2008, páginas 2935 - 2938) halló una serie de derivados de amino acetonitrilo (AAD) que exhiben alta actividad antihelmíntica contra las especies de nematodos parasitarios como por ej., *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*. Estos compuestos además muestran actividad contra las cepas de nematodos resistentes a los antihelmínticos de amplio espectro actualmente disponibles. Se presentan el descubrimiento, la síntesis, la relación estructura y actividad y los resultados biológicos.

40 Tsang et al. (Drug Discovery Today, Elsevier, Rahway, NJ, US, vol. 12, no. 3-4, 31 enero 2007, páginas 112 - 124) revisan el uso clínico del macrólido rapamicina para tratar el rechazo de injerto y la restenosis. El blanco mamífero de

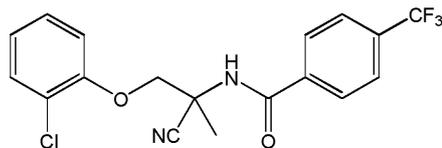
rapamicina (mTOR) es un controlador central del crecimiento celular y del organismo que integra las señales nutrientes y hormonales, y regula los diversos procesos celulares. Nuevos estudios han vinculado el mTOR con varias enfermedades humanas que incluyen cáncer, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurológicos. Los datos recientes han revelado, además, que el mTOR está involucrado en la regulación de la esperanza de vida y en las enfermedades relacionadas con la edad. Estos hallazgos demuestran la importancia del control del crecimiento en la patología de las principales enfermedades y de la salud humana general, y enfatiza el potencial terapéutico de la vía mTOR: Ahora, sorprendentemente, se ha hallado que los AAD se enlazan, además, al blanco de la vía mTOR (receptores) en las células mamíferas y como tal son eficaces en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la vía mTOR.

## 10 Sumario de la invención

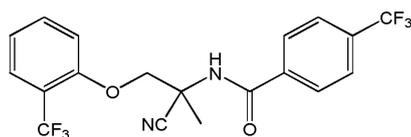
De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto o su sal o solvato aceptable desde el punto de vista farmacéutico, de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de una o más enfermedades relacionadas con la vía mTOR, en donde la única o más enfermedades relacionadas con la vía mTOR se selecciona de las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades relacionadas con la edad, la enfermedad relacionada con el rechazo de trasplante, las enfermedades inflamatorias crónicas, las enfermedades relacionadas con el almacenamiento de glucógeno, el lupus sistémico, las enfermedades relacionadas con la inflamación y la activación inmunitaria, la anemia, la leucopenia, la trombocitopenia, las enfermedades relacionadas con los recubrimientos de stents, la insuficiencia renal, obesidad, diabetes/resistencia a la insulina, las enfermedades relacionadas con el hígado graso no alcohólico, el riñón poliquístico y la fibrosis.

20 El compuesto puede ser el enantiómero (R) o (S) o el racemato. Preferiblemente, el compuesto es el enantiómero (S).

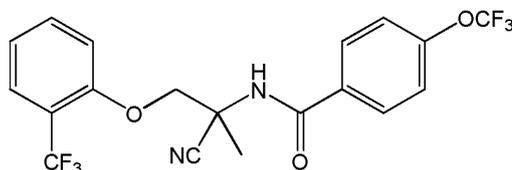
El compuesto se selecciona de uno cualquiera de los siguientes compuestos:



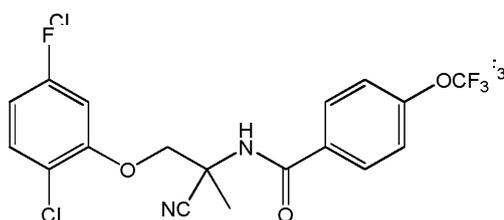
25 AAD 450;



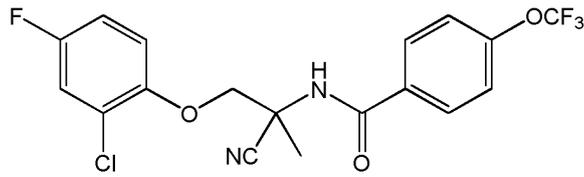
30 AAD 907;



35 AAD 970;

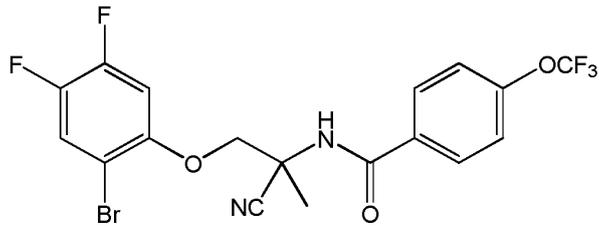


AAD 004;



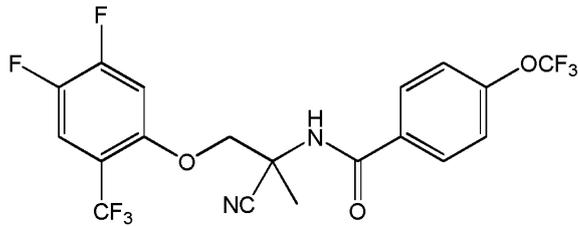
AAD 2009;

5



AAD 1336 o

10

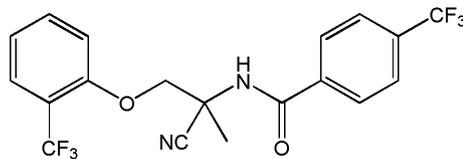


AAD 1470;

15 en donde cada uno de los compuestos anteriores es el enantiómero (R) o (S), o el racemato, o su sal o solvato aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

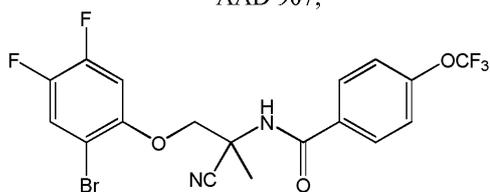
Preferiblemente, el compuesto se selecciona de uno cualquiera de los siguientes compuestos:

20

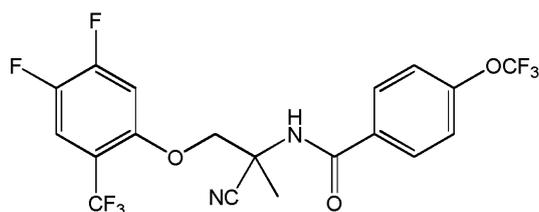


AAD 907;

25



AAD 1336; o



AAD 1470;

en donde cada uno de los compuestos anteriores es el enantiómero (R) o (S), o el racemato, (a menos que se especifique) o su sal o solvato aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

- 5 Preferiblemente, la única o más enfermedades relacionadas con la vía mTOR se selecciona de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson. Preferiblemente, la enfermedad relacionada con la vía mTOR es la enfermedad inflamatoria crónica, la cual puede ser artritis reumatoide. Preferiblemente, la fibrosis es fibrosis del hígado, fibrosis cardíaca o fibrosis pulmonar. Preferiblemente, la única o más enfermedades relacionadas con la vía mTOR se selecciona de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson.
- 10 Preferiblemente, la enfermedad relacionada con la vía mTOR es la enfermedad inflamatoria crónica, la cual puede ser artritis reumatoide o rechazo del órgano después de un trasplante.

#### Breve descripción de las figuras

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

20 La figura 2 muestra el efecto del MPL sobre la actividad de formación de colonias de las células OVCAR-3. Después de la incubación de las células con MPL (0, 5, 10 y 25 mmol/l) durante 72 horas, las células se lavaron, se transfirieron a placas agar, se cultivaron con su medio de crecimiento regular y se incubaron en condiciones estándares durante 2 semanas. Las células se fijaron con 100 % de metanol y se colorearon con 1 % de violeta cristal. Las colonias (un clúster de células superior a 50) se contaron en un microscopio (magnificación 3,5). El número de colonias contadas para diferentes grupos experimentales se expresa como un porcentaje del control.

30 La figura 3 muestra como MPL interfiere con la distribución del ciclo celular de las líneas celulares del cáncer de ovario. Las células OVCAR-3 (figura 3a) o A2780 (figura 3b) se trataron con MPL (0, 5, 10 y 25 mmol/l) durante 48 horas. Las células coloreadas con yodo de propodio se analizaron para conocer el contenido de ADN mediante el uso del análisis de citometría de flujo. Los resultados (ver tabla) se muestran como un porcentaje de células en las fases G1, S y G2/M. Cada valor representa la mediana  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes.

35 La figura 4 muestra que MPL interfiere con la expresión de las proteínas reguladores del ciclo celular cdk2, cdk4 y las ciclinas E y A. Las células se trataron con MPL (0, 5, 10 y 25 mmol/l) durante 48 horas. Los extractos de proteína entera se obtuvieron y se separaron por electroforesis y las inmunotransferencias se sondearon con los anticuerpos indicados. El análisis de inmunoelectrotransferencia que muestra los niveles de estas proteínas en cada extracto se analizó mediante el uso de los anticuerpos relevantes. La imagen representa la película radiográfica expuesta que se examinó. El gen de mantenimiento (GAPDH) se utilizó para confirmar la carga de proteína similar y la inmunotransferencia.

40 La figura 5 muestra un análisis de inmunotransferencia de PARP y PARP escindido en las células tratadas con MPL. Las células OVCAR-3 y A2780 que se desarrollan en condiciones de cultivo celular se incubaron con varias concentraciones de MPL [0, 5, 10, 25  $\mu$ M] durante 24, 48 o 72 horas. Los lisados celulares se prepararon y se analizaron por transferencia Western para la determinación de PARP y PARP escindido.

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

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

La figura 8 muestra el efecto del MPL sobre ATP y la relación de ADP/ATP en la línea celular OVCAR-3 del cáncer de ovarios humano.

5 La exposición de las células a MPL en condiciones de cultivo celular estándares provoca una reducción de los niveles de ATP y en consecuencia un incremento en la relación ADP/ATP. Los niveles de ADP y ATP en los medios se midieron mediante el uso de los kits de ensayo colorimétrico/fluorométrico comerciales de Abcam junto con el kit de ensayo ApoGlow de Lonza (Sídney, subsidiaria de Australia). Cada valor representa la media + s.e.m. de al menos dos determinaciones.

10 La figura 9 muestra la interferencia de MPL con la viabilidad celular. A) Imagen microscópica de las células OVCAR-3 expuestas a MPL (0, 5, 10, 25  $\mu$ M) durante 72 horas. Las líneas celulares del cáncer de ovario humano OVCAR-3, A2780, SKOV-3, IGROV-1 se cultivaron en presencia de MPL (0, 5, 10, 25, mmol/l) durante 72 horas. El efecto del MPL sobre la viabilidad celular se evaluó mediante el uso del ensayo de azul de tripano estándar. Las células control (tratadas con vehículo) se tomaron para presentar el 100 % viables y los grupos tratados con MPL se expresan como porcentaje de control. Cada concentración de medicamento se ensayó por cuadruplicado y cada experimento se repitió, al menos, dos veces. Los datos (mediana  $\pm$  SEM) se presentan como % del control. Para las comparaciones estadísticas, cada grupo tratado con el medicamento se comparó con el grupo control mediante el uso de la prueba t de Student y un valor p de 0,5 o menos se consideró que presenta un cambio significativo ( $p < 0,5$ ), \* =  $< 0,05$ , \*\*  $< 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

20 La figura 10 muestra el efecto del MPL sobre la viabilidad de las células normales y muestra que el efecto antiproliferativo del MPL está orientado a la célula cancerosa. Las células normales HOSE, CHO, HEK y HUVEC se cultivaron en presencia de MPL (0, 5, 10, 25, mmol/l) durante 72 horas. El efecto del MPL sobre la viabilidad celular se evaluó mediante el uso del ensayo de azul de tripano estándar. Los resultados se presentan como la mediana  $\pm$  SEM en comparación con control (100 %).

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

35 La figura 12 muestra que el efecto antiproliferativo de MPL es independiente de los receptores nicotínicos. Las células se trataron previamente (30 min) con concentraciones crecientes de nicotina, carbacol o los antagonistas del receptor, atropina, mecamilamina, tubocurarina, y  $\alpha$ -bungarotoxina. Se agregó MPL (5  $\mu$ M) y se dejó en la incubadora de cultivo celular durante 72 horas. Cada concentración del medicamento se ensayó por cuadruplicado y cada experimento se repitió dos veces. Los valores combinados (mediana  $\pm$  SEM) se presentan como % del control.

La figura 13 muestra como MPL inhibe la proliferación de las células de glioma. La comparación del efecto del tratamiento con MPL (0, 5, 10, 25, 50  $\mu$ M; 72 h) sobre la proliferación de las líneas celulares de glioma U87-MG U251 versus los astrocitos normales en condiciones de cultivo celular normales y mediante el uso del ensayo de proliferación SRB. Los datos se presentan como % de control.

45 La figura 14 muestra como MPL induce la autofagia. El tratamiento de células de glioma U87 resistentes a la quimio con MPL provoca la autofagia, la cual es confirmada por el aumento de expresión de LC3-II de una manera dependiente de la concentración. Las células de glioma U87-MG y U251 tratadas con MPL mostraron formación dependiente de la concentración de autofagia (que se muestra como vacuolas). La conversión dependiente de la concentración de LC3-I a LC3-II confirma el fenómeno creciente de autofagia en estas células.

50 La figura 15 muestra el efecto del MPL sobre la actividad de formación de colonias de las células OVCAR-3 y A2780. Después de la incubación de las células con MPL (0, 5, 10 y 25  $\mu$ M) durante 72 horas, las células se lavaron, se transfirieron a placas de agar, se cultivaron con su medio de crecimiento regular y se incubaron en condiciones estándares durante 2 semanas. Las células se fijaron con 100 % de metanol y se colorearon con 1 % de violeta cristal. Las colonias (clúster de células superior a 50) se contaron en un microscopio (magnificación 3,5). El número de colonias que se contaron para diferentes grupos experimentales se expresa como % del control.

La figura 16 muestra como MPL interfiere con la progresión del ciclo celular de las líneas celulares del cáncer de ovario. Las células OVCAR-3 o A2780 se trataron con MPL (0, 5, 10, 25  $\mu$ M) durante 48 horas y se examinaron por análisis de citometría de flujo (FACS) después de la coloración de las células con PI. La figura y los datos presentan el cambio inducido por MPL en la distribución celular en varias fases del ciclo celular, aquí se muestra como porcentaje de células en las fases G1 S y G2/M. Cada valor representa la mediana  $\pm$  SEM de 2 experimentos independientes.

La figura 17 muestra cómo MPL interfiere con la expresión de las proteínas reguladores del ciclo celular cdk2, cdk4, las ciclinas E y A. Las células se trataron con MPL (0, 5, 10, 25  $\mu$ M) durante 24, 48 o 72 horas. Los extractos de proteína entera se obtuvieron y se separaron por electroforesis y las inmunotransferencias se sondearon con los anticuerpos indicados. El análisis de inmunoelectrotransferencia que muestra los niveles de estas proteínas en cada extracto se analizó mediante el uso de los anticuerpos relevantes. La imagen representa la película radiográfica expuesta que se examinó. El gen de mantenimiento (GAPDH) se utilizó para confirmar la carga de proteína similar y la inmunotransferencia.

La figura 18 muestra cómo MPL escinde PARP. La exposición de las células OVCAR-3 o A2780 a MPL (0, 5, 10, 25  $\mu$ M) durante 24, 48 o 72 horas origina la escisión de PARP, lo cual provoca el desmontaje celular y sirve como marcador de las células moribundas.

Las figuras 19A y 19B muestran cómo MPL disminuye los niveles de ATP. La exposición de las células OVCAR-3 o A2780 a MPL (0, 5, 10, 25  $\mu$ M) durante 24, 48 o 72 horas origina la escisión de PARP, lo cual provoca el desmontaje celular y sirve como marcador de las células moribundas.

La figura 20 muestra el efecto de monepantel administrado i.p. (por vía intraperitoneal) sobre el crecimiento del tumor s.c. (subcutáneo) en ratones nude. Se inyectaron s.c. 2,5 millones de células OVCAR-3 de crecimiento en fase logarítmica, dentro del flanco izquierdo de cada ratón. El crecimiento del tumor se monitoreó mediante mediciones calibradas y los volúmenes del tumor se determinaron a través de la medición de los diámetros ortogonales. El volumen estimado del tumor se calculó basado en la fórmula  $1/2$  (longitud  $\times$  ancho<sup>2</sup>) donde el ancho es el más corto de las dos mediciones ortogonales. El tratamiento se inició 7 días posteriores a la inyección de célula tumoral antes de lo cual, los ratones se aleatorizaron y se asignaron a tratamiento o al grupo control (6 por grupo). El monepantel que se suspendió en 0,5 % de HPMC se administró i.p. a 2,5 o 25 mg/kg dos veces a la semana. El grupo control se trató con el vehículo únicamente.

La figura 21 muestra el efecto de monepantel administrado i.p. sobre el crecimiento del tumor s.c. en ratones nude. Se inyectaron s.c. células OVCAR-3 de crecimiento en fase logarítmica, dentro del flanco izquierdo de cada ratón. El crecimiento del tumor se monitoreó mediante mediciones calibradas y los volúmenes del tumor se determinaron a través de la medición de los diámetros ortogonales. El volumen estimado del tumor se calculó basado en la fórmula  $1/2$  (longitud<sup>3</sup>  $\times$  ancho<sup>2</sup>) donde el ancho es el más corto de las dos mediciones ortogonales. El tratamiento se inició 7 días posteriores a la inyección de célula tumoral antes de lo cual, los ratones se aleatorizaron y se asignaron a tratamiento o al grupo control (6 por grupo). El monepantel que se suspendió en 0,5 % de HPMC se administró i.p. a 25 o 50 mg/kg dos veces a la semana. El grupo control se trató con el vehículo únicamente.

La figura 22 muestra el efecto de monepantel oral sobre el crecimiento del tumor en ratones nude. Se inyectaron s.c. células OVCAR-3 dentro del flanco izquierdo de cada ratón. El crecimiento del tumor se monitoreó mediante mediciones calibradas y se determinaron los volúmenes de los diámetros ortogonales, y el volumen estimado del tumor se calculó basado en la fórmula  $1/2$  (longitud<sup>3</sup>  $\times$  ancho<sup>2</sup>) donde el ancho es el más corto de las dos mediciones ortogonales. El tratamiento se inició 7 días posteriores a la inyección de célula tumoral antes de lo cual, los ratones se aleatorizaron y se asignaron a tratamiento o al grupo control (6 por grupo). El monepantel que se suspendió en 0,5 % de HPMC se administró por vía oral (100 ml) a 50 o 100 mg/kg tres veces a la semana. El grupo control se trató por vía oral con el vehículo únicamente.

Las figuras 20-22 muestran, en general, el efecto del MPL sobre xenoinjertos s.c. en ratones nude hembras. Los ratones se inocularon en el flanco izquierdo con 2,5 millones de células OVCAR-3 humanas de crecimiento en fase logarítmica. El crecimiento del tumor se monitoreó mediante mediciones calibradas y los volúmenes del tumor se determinaron a través de la medición de los diámetros ortogonales. El volumen estimado del tumor se calculó basado en la fórmula  $1/2$  (longitud<sup>3</sup>  $\times$  ancho<sup>2</sup>) donde el ancho es el más corto de las dos mediciones ortogonales. El tratamiento se inició 7 días posteriores a la inyección de célula tumoral antes de lo cual, los ratones se aleatorizaron y se asignaron a tratamiento o al grupo control (5 -6 por grupo). El monepantel que se suspendió en 0,5 % de HPMC se administró i.p. a 2,5 o 25 mg/kg (figura 19), 25 y 50 mg/kg (figura 20) o por vía oral a 50 y 100 mg/kg; todo se administró tres veces a la semana. Los ratones del grupo control recibieron un volumen similar de 0,5 % de HPMC en una manera exactamente similar y en el mismo tiempo.

La figura 23 muestra cómo MPL induce la necrosis en los tejidos tumorales. El tejido tumoral de los xenoinjertos subcutáneos en ratones nude se trató con MPL que se administró por vía oral en días alternativos a 50 o 100 mg/kg/día. Las imágenes histológicas de los tumores se muestran en tinción de hematoxilina y eosina (H&E: hilera superior), lo que

indica una profunda necrosis inducida por el medicamento (cabeza de flecha negra; magnificación 3 10). Una imagen representativa de la histología del tumor de los tumores extirpados de los ratones tratados con MPL muestra una necrosis extensa a la dosis superior de 100 mg/kg (tumor s.c., tratamiento oral, x 3 semanal durante 2 semanas).

5 La figura 24 muestra las células OVCAR-3 tratadas con 10  $\mu$ M de MPL durante los puntos de tiempo indicados en las condiciones de cultivo celular. Se preparó el análisis por transferencia Western de los lisados celulares a partir de las células OVCAR-3 tratadas con 10  $\mu$ M de MPL durante 1, 4 o 24 horas en las condiciones de cultivo celular. Los resultados muestran la inhibición de la fosforilación (activación) de ambas mTOR y su vía de señalización corriente abajo p70S6K.

10 La figura 25 muestra la expresión de proteínas en las células OVCAR-3 de ovario humano tratadas *in vitro* con MPL. El análisis por transferencia Western de los lisados celulares se preparó a partir de células OVCAR-3 tratadas con 0, 5, 10, 15 y 25  $\mu$ M de MPL durante 48 horas en las condiciones de cultivo celular. Los resultados muestran la regulación descendente de la expresión de c-Myc y de la ciclina D1.

15 La figura 26 muestra el efecto inhibitorio de MPL sobre la expresión del tumor de la señalización relacionada con la mTOR en los tumores de OVCAR-3 tratados con MPL. El análisis por transferencia Western de los lisados tumorales se preparó a partir de los tumores de OVCAR-3 desarrollados s.c. en ratones nude hembras. Los ratones se trataron a partir del día 8 posterior a la inoculación celular durante 3 semanas con MPL (25, 50 mg/kg que se suspendieron en 0,5 % de HPMC administrado i.p.) o el vehículo (0,5 % de HPMC). Veinticuatro horas después de la última dosis, los tumores se extirparon y se congelaron a -80 °C. El análisis por transferencia Western de los tumores muestra la represión de la señalización de mTOR. La expresión de proteínas de la mTOR junto con c-Myc, las ciclinas D1 y E2 y las CDK 2 y 4, se reprimió en los tumores extirpados de los ratones tratados con MPL.

20

Las figuras 27A y 27B muestran el efecto inhibitorio de MPL sobre la fosforilación de NF- $\kappa$ B p65.

La figura 28 muestra el efecto inhibitorio de MPL sobre la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$ .

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

La figura 30 muestra que el MPL causa regulación descendente de la expresión de IL-6.

25 La figura 31 muestra que el MPL causa regulación descendente de la expresión de TGF- $\beta$ .

La figura 32 muestra que el MPL anula la expresión NO.

#### Definiciones

«Halógeno» significa flúor, cloro, bromo o yodo, preferiblemente flúor o cloro.

30 «Alquilo» significa un grupo hidrocarbonado alifático el cual puede ser de cadena recta o ramificada y comprende 1 a 20 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquilo preferidos contienen 1 a 12 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquilo más preferidos contienen 1 a 6 átomos de carbono en la cadena. Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferior como por ej., metilo, etilo o propilo se unen a una cadena de alquilo lineal. «Alquilo inferior» significa un grupo que tiene 1 a 6 átomos de carbono en la cadena la cual puede ser recta o ramificada. «Alquilo» puede estar no sustituido u opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes los cuales pueden ser iguales o diferentes, cada sustituyente se selecciona independientemente del grupo que consiste de halo, alquilo, arilo, cicloalquilo, ciano, hidroxilo, alcoxi, alquiltio, amino, -NH(alquilo), -NH(cicloalquilo), -N(alquilo)<sub>2</sub>, carboxi y -C(O)O-alquilo. Los ejemplos no limitantes de grupos alquilo adecuados incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y t-butilo.

35

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

45 «Heteroarilo», por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un grupo cíclico o un grupo policíclico que tiene desde cinco a doce átomos del anillo que se seleccionan de C, N, O y S, en el cual al menos un heteroátomo del anillo es O, N o S, y en donde al menos uno de los anillos constituyentes es aromático. Los grupos heteroarilo ilustrativos para su uso en la invención incluyen carbazolilo, carbolinilo, cromenilo, cinnolinilo, furanilo, benzofuranilo, benzofurazanilo, isobenzofuranilo, imidazolilo, bencimidazolilo, bencimidazolonoilo, indazolilo, indolilo, isoindolilo, indolinilo, indolazolinilo, indinilo, oxadiazolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, isoxazolilo, piranilo, pirazinilo, pirazolilo, benzopirazolilo, piridazinilo,

piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, quinolilo, isoquinolilo, tetrazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, tienilo, benzotioenilo, benzotiazolilo, quinoxalinilo, triazinilo y triazolilo, y sus N-óxidos.

Un subgrupo de grupos heteroarilo tiene 5 átomos del anillo. Los grupos heteroarilo ilustrativos en esta realización son pirazolilo, piridilo, tiazolilo e imidazolilo.

- 5 Otro subgrupo de los grupos heteroarilo tiene 6 átomos del anillo. Los grupos heteroarilo ilustrativos en esta realización son piridinilo y pirimidinilo.

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

- 10 Cuando un grupo heteroarilo, como se define en la presente memoria, está sustituido, el sustituyente puede estar ligado a un átomo de carbono del anillo del grupo heteroarilo, o un heteroátomo del anillo (es decir, un nitrógeno, oxígeno o azufre), el cual tiene una valencia que permite la sustitución. Preferiblemente, el sustituyente está ligado a un átomo de carbono del anillo. De manera similar, cuando un grupo heteroarilo se define como un sustituyente en la presente memoria, el punto de unión puede ser un átomo de carbono del anillo del grupo heteroarilo, o un heteroátomo del anillo
- 15 (es decir, un nitrógeno, oxígeno o azufre), el cual tiene una valencia que permite la unión. Preferiblemente, la unión es en un átomo de carbono del anillo.

«Heteroátomo» significa un átomo que se selecciona de N, O, P y S. Donde sea necesario, cualquier valencia no diseñada se selecciona independientemente de H, OH, carbonilo, n-alquilo o alcoxi.

«n» puede ser 1 a 20, preferiblemente 1 a 10, más preferiblemente 1 a 6, y más preferiblemente 1 a 4.

- 20 «Alcoxi» significa un grupo alquilo-O- en el cual el grupo alquilo es como se describió previamente. Los ejemplos no limitantes de grupos alcoxi adecuados incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi y n-butoxi. La unión al resto principal es a través del éter oxígeno.

- 25 «Sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico» se refiere a las sales de adición de ácido convencionales o a las sales de adición de base que retienen la efectividad biológica y las propiedades de los compuestos, y se forman a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos adecuados o bases orgánicas o inorgánicas. Las sales de adición de ácido de muestra incluyen las que derivan de ácidos inorgánicos como por ej., ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yohídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido fosfórico y ácido nítrico, y las que derivan de los ácidos orgánicos como por ej., ácido p-tolueno-p-sulfónico, ácido salicílico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido nítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fumárico, y similares. Las sales de adición de base de muestra incluyen las que
- 30 derivan de amonio, potasio, sodio e hidróxidos de amonio cuaternario, como por ejemplo, hidróxido de tetrametil amonio. La modificación química de un compuesto farmacéutico (es decir, medicamento) en una sal es una técnica bien conocida para los químicos farmacéuticos para obtener la estabilidad física y química mejorada, la higroscopicidad, la capacidad de flujo y la solubilidad de los compuestos. Ver, por ej., H. Ansel et. al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (6° Ed. 1995) en págs. 196 y 1456-1457.

- 35 «Aceptable desde el punto de vista farmacéutico» como por ej., portador, excipiente, etc. aceptable desde el punto de vista farmacéutico, significa aceptable desde el punto de vista farmacológico y sustancialmente no tóxico para el sujeto a quien se administra el compuesto particular.

- 40 «Sustituido» como en alquilo sustituido, significa que la sustitución puede ocurrir en una o más posiciones y, a menos que se indique lo contrario, que los sustituyentes en cada lugar de sustitución se seleccionan independientemente de las opciones especificadas, lo que significa que más de un sustituyente puede estar presente de manera simultánea en varios sitios.

- Los «Profármacos» de los compuestos y los «solvatos» de los compuestos de la invención también se contemplan en la presente memoria. Una discusión sobre los profármacos se proporciona en T. Higuchi and V. Stella, *Pro-drugs as Novel Delivery Systems* (1987) 14 of the A.C.S. Symposium Series, and in *Bioreversible Carriers in Drug Design*, (1987) Edward B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press. El término «profármaco» significa un compuesto (por ej., un precursor de medicamento) que se transforma *in vivo* para dar un compuesto o un metabolito, sal o solvato aceptable desde el punto de vista farmacéutico del compuesto. La transformación puede ocurrir mediante varios mecanismos (por ej., mediante procesos metabólicos o químicos). Una discusión sobre el uso de los profármacos se proporciona en T. Higuchi and W. Stella, "Prodrugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, and in *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.
- 45
- 50

«Metabolitos» de los compuestos se refiere a los intermediarios y a los productos del metabolismo.

Los compuestos de la invención pueden contener centros asimétricos o quirales, y por lo tanto, existen en diferentes formas estereoisoméricas. Es la intención de que todas las formas estereoisoméricas de los compuestos, como así también sus mezclas, incluso las mezclas racémicas, forman parte de la presente invención. Además, la presente invención abarca todos los isómeros geométricos y posicionales. Las mezclas diastereoméricas pueden ser separadas en sus diastereómeros individuales sobre la base de sus diferencias físico químicas mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, como por ej., por cromatografía y/o cristalización fraccional. Los enantiómeros pueden ser separados convirtiendo de la mezcla enantiomérica en una mezcla diastereomérica mediante la reacción con un compuesto activo ópticamente apropiado (por ej., un auxiliar quiral como por ej. un alcohol quiral o cloruro del ácido de Mosher), separando los diastereómeros y convirtiendo (por ej., hidrolizando) los diastereómeros individuales a los correspondientes enantiómeros puros. Los enantiómeros pueden ser, además, separados mediante el uso de la columna HPLC quiral. Los centros quirales de la presente invención pueden tener la configuración S o R como se define mediante la IUPAC 1974.

El uso de los términos «sal» o «solvato» y similar, se aplica, igualmente, a la sal y al solvato de los enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros, isómeros posicionales o racematos de los compuestos de la invención.

Como se utiliza en la presente solicitud, la forma singular «un», «una» y «el/la» incluye las referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Como se utiliza en la presente memoria, el término «que comprende» significa «que incluye». Las variantes de la palabra «que comprende», como por ej., «comprende», tienen los significados correspondientemente variados. De este modo, por ejemplo, una composición farmacéutica «que comprende» un compuesto de la invención puede consistir, exclusivamente, de ese compuesto o puede incluir uno o más componentes adicionales (por ej., un portador, excipiente y/o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico).

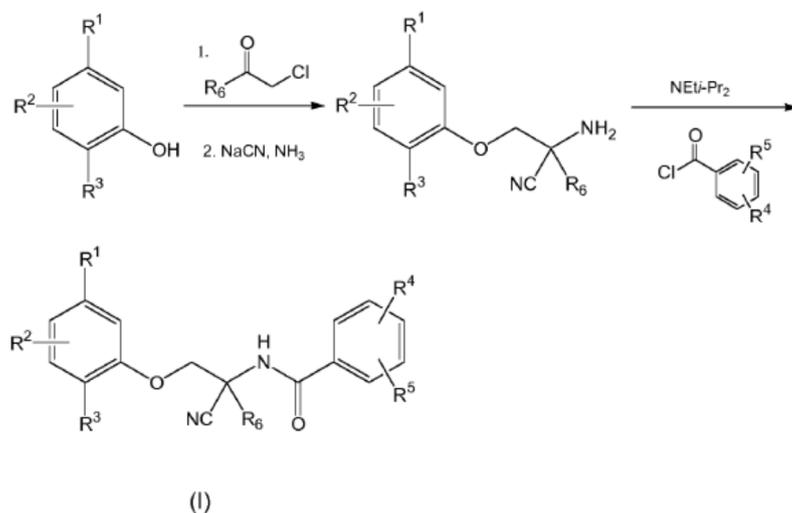
Como se utiliza en la presente memoria, el término «pluralidad» significa más de uno. En ciertos aspectos o realizaciones específicas, una pluralidad puede significar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37,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

«Cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico» significa una cantidad de, al menos, un compuesto o su sal o solvato aceptable desde el punto de vista farmacéutico, que inhibe sustancialmente la proliferación y/o evita la diferenciación de una célula tumoral humana, que incluye las líneas celulares tumorales humanas. El término «cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico», como se utiliza en la presente memoria, incluye dentro de su significado una cantidad no tóxica pero suficiente de un agente o composición para su uso en la presente invención para proporcionar el efecto terapéutico deseado. La cantidad exacta necesaria variará de sujeto a sujeto según factores tales como las especies a ser tratadas, la edad y la condición general del sujeto, la gravedad de la afección a ser tratada, el agente particular que se administra, el modo de administración, etc. De este modo, no es posible especificar una «cantidad eficaz» exacta aplicable a todas las realizaciones. Sin embargo, para cualquier caso dado, una «cantidad eficaz» apropiada puede ser determinada por un experto en la técnica mediante el uso de una experimentación únicamente de rutina.

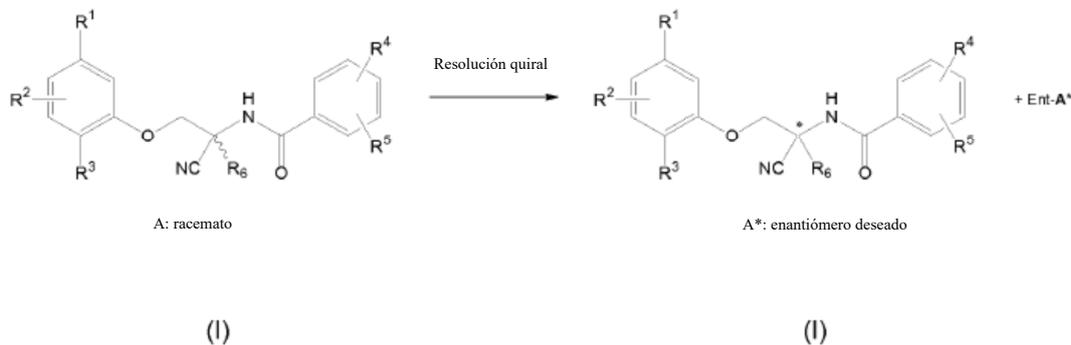
### Descripción detallada

Los AAD son una clase de compuestos que pueden ser sintetizados mediante el uso del conocimiento ordinario de la metodología de síntesis orgánica. Por ejemplo, los AAD pueden ser sintetizados mediante la derivatización de fenoles con cloro acetona, la reacción de Strecker y la acilación de la amina resultante con cloruros de aroilo (como se muestra en el esquema 1). Donde sea necesario, se puede obtener un enantiómero particular, por ejemplo, por resolución quiral (como se muestra en el esquema 2).

Esquema 1:



Esquema 2:



5 Los AAD son una clase de productos químicos que han sido utilizados previamente para tratar los nematodos resistentes al medicamento. La investigación a la fecha ha puesto énfasis en los receptores de acetil colina nicotínica con focalización en el MPL en nematodos, y han sido utilizados extensamente para el tratamiento de parásitos en rumiantes.

10 La mTOR (el blanco mamífero de rapamicina), también conocida como blanco mecanicista de la rapamicina o la proteína de unión a FK506 12-proteína asociada a la rapamicina 1 (FRAP1), es una proteína la cual en humanos es codificada por el gen FRAP1. La mTOR es una serina/treonina proteína quinasa (y pertenece específicamente a la familia de la proteína quinasa relacionada con la fosfatidilinositol 3-quinasa) que regula el crecimiento celular, la proliferación celular, la motilidad celular, la supervivencia celular, la síntesis de proteínas y la transcripción. La mTOR es la subunidad catalítica de los dos complejos moleculares mTORC1 y mTORC2. A pesar del hecho de que el MPL es similar a la rapamicina en la interferencia con la vía mTOR, la rapamicina no es típicamente un antihelmíntico que indica que el MPL es muy diferente a los inhibidores de mTOR conocidos. Al igual que la rapamicina, no obstante, los AAD tienen tanto cualidades inmunosupresoras como actividad anti-cancerosa.

20 La familia TOR de proteínas tiene funciones pleiotrópicas y participa en la regulación de la iniciación de la transcripción de ARNm y la traducción de la proteína en respuesta a las concentraciones intracelulares de aminoácidos y otros nutrientes esenciales, en la organización del citoesqueleto de actina, el tráfico de la membrana, la degradación de la proteína, la señalización PKC y la biogénesis del ribosoma. Es más, la vía mTOR regula muchos procesos celulares principales y está implicada en un número creciente de afecciones patológicas, que incluyen cáncer, obesidad, diabetes

tipo 2 y neurodegeneración.

Hay dos complejos que contienen la vía mTOR: un complejo sensible a la rapamicina (mTORC1), el cual está definido por su interacción con la proteína accesoria Raptor (proteína reguladora asociada al mTOR), y un complejo insensible a la rapamicina (mTORC2), el cual está definido por su interacción con RICTOR (compañero de mTOR insensible a rapamicina). El mTORC1 fosforila los efectores mTOR bien caracterizados S6 quinasa 1 (S6K1 también conocida como p70S6K) y la proteína 1 de unión al factor de iniciación eucariota 4E (eIF4E) (4EBP1, la cual está codificada por la proteína estable al ácido y al calor fosforilada del gen regulada por insulina 1 (PHAS1). El mTORC2 controla el citoesqueleto de actina como así también AKT/PKB.

La mTOR regula las vías de transducción de señal esenciales y está involucrada en el estímulo de crecimiento del acoplamiento a la progresión del ciclo celular. En respuesta a las señales que inducen el crecimiento, las células estables aumentan la traducción de un subconjunto de ARNm, los productos proteicos los cuales son necesarios para la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular. La PI3K y AKT son los elementos claves de la vía corriente arriba que enlaza la ligación de los receptores del factor de crecimiento al estado de fosforilación y activación de la mTOR. Con respecto a la función de la vía de PI3K / AKT / mTOR en la génesis y proliferación de las células cancerosas, los elementos de la vía PI3K / AKT / mTOR han demostrado ser activados por la familia del homólogo de oncogén viral de leucemia eritroblástica (ERB) de receptores superficiales, los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR) y Ras oncogénico. La sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1R) y su ligando, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1), ocurre normalmente en varios cánceres. Además, varios elementos de la vía PI3K / AKT / mTOR han demostrado estar activados constitucionalmente en los tumores malignos. La hiperactivación de los elementos de señalización PI3K / AKT / mTOR en los tumores malignos deficientes en PTEN indica que los cánceres dependen, con frecuencia, de esta vía para el crecimiento y el sustento.

Después de la fosforilación, la mTOR modula dos vías de señalización corriente abajo distintas que controlan la traducción de subconjuntos específicos de ARNm que incluyen la S6K1 y 4EBP1. La activación de PI3K y/o AKT, y/o la pérdida de la función supresora de PTEN, es necesaria y suficiente para inducir la fosforilación de ambas S6K1 y 4EBP1 a través de mTOR: De este modo, los derivados de rapamicina bloquean la fosforilación de S6K1 y 4EBP1 en las células que expresan la PI3K o AKT activada o que carecen de PTEN. El proceso mediante el cual la mTOR transmite las señales depende de su interacción con Raptor, una proteína evolucionadamente conservada de 150 kDa que forma un complejo con mTOR y, además, se une a ambas 4EBP1 y S6K1. Si bien Raptor misma no es una quinasa, es necesaria para la fosforilación mediada por la vía mTOR de 4EBP1 y S6K1.

La 4EBP1 es una pequeña proteína que reprime la iniciación de la traducción de la proteína a través de su asociación con eIF4E, la subunidad de unión a la tapa del ARNm del complejo eIF4F. La sobreexpresión de eIF4E sola es suficiente para inducir la transformación celular. La unión de 4EBPs a eIF4E depende del estado de fosforilación de 4EBP1.

Con respecto a la interacción de mTOR con las proteínas de traducción, en las células estables y las condiciones privadas del factor de crecimiento, la 4EBP1 no fosforilada se une con firmeza a eIF4E inhibiendo la iniciación de la traducción de la proteína. En respuesta al estímulo proliferativo disparado por las hormonas, los factores de crecimiento, los mitógenos, las citoquinas y los agonistas acoplados a la proteína G, la 4EBP1 se fosforila en varios sitios de serina/treonina a través de la acción de la mTOR y otras quinastas, promoviendo la disociación de eIF4E a partir de 4EBP1. La eIF4E libre puede unirse a eIF4G (una proteína de andamio grande), a eIF4A (una ARN helicasa dependiente de ATP) y a eIF4B formando el complejo eIF4F de múltiples subunidades y facilita la traducción de la proteína dependiente de la tapa. Esta cascada de eventos induce un aumento en la traducción de ARNm con los elementos reguladores en las regiones terminales no traducidas de 5' (5'-UTR), que incluye los ARNm que codifican c-MYC, la ciclina D1 y la ornitina decarboxilasa. Por el contrario, la carencia del factor de crecimiento o el tratamiento con rapamicina da lugar a la defosforilación de 4EBP1, al aumento de la unión a eIF4E y una deficiencia concomitante de la iniciación de la traducción de los ARNm con los 5'UTR que es necesaria para la transición de la fase G1 a S del ciclo celular.

Hay abundante evidencia experimental que indica que la mTOR es directamente responsable de la fosforilación de 4EBP1 y de la activación de eIF4E inducida por varios estímulos mitogénicos. Por ejemplo, la fosforilación de 4EBP1 en las células tratadas con insulina ha mostrado ser efectivamente bloqueada por los inhibidores de mTOR. En realidad, una relación celular baja de 4EBP1 y eIF4E pueden originar resistencia a los inhibidores de mTOR. Es más, los sitios de 4EBP1 que son fosforilados por la mTOR son idénticos a los que son inducidos por el tratamiento con insulina, y son rápidamente defosforilados después de la exposición a los inhibidores de mTOR. Algunas observaciones indican que la mTOR podría actuar, además, indirectamente como un inhibidor de una proteína serina/treonina fosfatasa, la cual funciona para defosforilar la 4EBP1 cuando las condiciones son apropiadas para la transición de la fase G1 a S.

Hay evidencia sustancial la cual indica que el MPL se une a los receptores de acetil colina en los nematodos y carece de actividad en las células mamíferas. No obstante como se mencionó anteriormente, ahora se ha hallado, sorprendentemente, que el MPL se une selectivamente a los receptores de mTOR en las células mamíferas.

Los compuestos de la presente invención actúan como inhibidores de mTOR quinasa selectivos en células mamíferas mediante la unión a los receptores de mTOR, y por lo tanto pueden ser utilizados en el tratamiento de cualquier enfermedad relacionada con la vía mTOR.

5 Muchos medicamentos para el cáncer, como por ej., rapamicina y sus análogos, se unen a la mTOR a través de un dominio el cual está separado del sitio catalítico y, por lo tanto, bloquean solo un subconjunto de funciones de la mTOR. Estos medicamentos podrían activar una vía de supervivencia dependiente de la vía mTOR que provoca la falla del tratamiento.

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

15 El MPL parece proporcionar la inhibición muy selectiva de la mTOR, a causa de su baja toxicidad y, cuando se utiliza como un antihelmíntico, su tolerancia por parte de los animales en dosis de hasta 2000 mg/kg. En los modelos de animales, los actuales inventores han mostrado que los efectos antineoplásicos del MPL se observan en dosis sorprendentemente bajas de entre 5-50 mg/kg.

20 La señalización de mTOR es regulada hacia arriba, con frecuencia, en el cáncer. La interacción del MPL con los receptores de mTOR mamíferos puede ser selectiva para las células tumorales que causan la inhibición del crecimiento tumoral (véase la Solicitud de Patente Provisoria Australiana No. 2012901199 y el documento PCT/AU2013/000290).

25 Por ejemplo, los actuales inventores han hallado, sorprendentemente, que los compuestos como por ej. MPL y MPL-SO2 tienen actividad antineoplásica. Más específicamente, los compuestos que incluyen MPL y MPL-SO2 han mostrado inhibir la proliferación celular y la formación de colonias de líneas celulares cancerosas. Por ejemplo, las líneas celulares de cáncer de ovario han mostrado ser muy sensibles al MPL y MPL-SO2, y es evidente que otras líneas celulares son, además, muy sensibles. Estas incluyen cáncer de mama, mesotelioma, cáncer de próstata y líneas celulares de glioblastoma. El MPL es muy eficaz contra la PC-3 quimio resistente, insensible al andrógeno y contra las células cancerosas de próstata DU 145. De manera similar, la replicación de las células PET y YOU (mesotelioma) y las células U87 (glioblastoma), las cuales son muy resistentes a la quimioterapia, son profundamente reprimidas por el MPL.

30 Los actuales inventores han mostrado que el MPL y sus análogos tienen aplicación en las siguientes enfermedades dependientes de la mTOR:

- La señalización de mTOR se entrecruza con la patología de la enfermedad de Alzheimer (AD) en varios aspectos, lo que indica su posible función como contribuyente para la progresión de la enfermedad. En general, los hallazgos demuestran la hiperactividad de la señalización de mTOR en los cerebros de la AD. Por ejemplo, los estudios postmortem del cerebro de AD humano revelan la desregulación en PTEN, Akt, S6K y mTOR;
- 35 • Los estudios que utilizan modelos de ratón de la enfermedad de Huntington muestran que el tratamiento con rapamicina facilita la eliminación de los agregados de huntington. De manera similar, el MPL puede eliminar dichos agregados proporcionando nuevos tratamientos para esta afección;
  - Enfermedades relacionadas con la edad;
  - Rechazo al trasplante;
  - 40 • Enfermedades inflamatorias crónicas (por ej., artritis reumatoide);
  - Enfermedades del almacenamiento del glucógeno;
  - Selectivas para ciertos cánceres;
  - Lupus sistémico: la señalización de mTOR se incrementa en las células SLE T, y la inhibición de la señalización de mTOR con rapamicina ha mostrado ser eficaz en el tratamiento de SLE humana. Los pacientes con SLE tratados con rapamicina muestran disminución de los niveles de calcio en los valores de referencia, y disminución del influjo de calcio después de la estimulación de TCR, pero no muestran un cambio en la función mitocondrial, lo que indica la especificidad del tratamiento con rapamicina sobre esta manifestación de la enfermedad;
  - 45 • Inflamación y activación inmunitaria;

- Anemia;
- Leucopenia;
- Trombocitopenia;
- Recubrimiento de stent;
- 5 • Insuficiencia renal;
- Obesidad;
- Diabetes/resistencia a la insulina;
- Hígado graso no alcohólico;
- Riñón poliquístico;
- 10 • Enfermedad de Parkinson: la rapamicina inhibidora del mTORC1 evitó el desarrollo de disquinesia sin afectar la eficacia terapéutica de L-DOPA. De este modo, la cascada de señalización de mTORC1 representa un blanco para el diseño de los tratamientos anti-parkinsonianos;
- Fibrosis (como por ej., hepática, cardíaca o fibrosis pulmonar). Debido a la sensibilidad de los fibroblastos al MPL, la relación entre PI3K/mTOR y TGFbeta, y el efecto sobre la expresión/actividad de lisil oxidasa (LOX), el MPL puede ser utilizado en el tratamiento de fibrosis. El aumento de la expresión LOX cardíaca se encuentra en pacientes con insuficiencia / fibrosis cardíaca y, de manera similar, en un número de enfermedades pulmonares y renales / LOX / fibroblastos. Además, la fibrosis es un importante factor de contribución en varios tipos de cánceres, como por ej., cáncer de mama y pancreático.
- 15

20 Sin quedar atados a la teoría, se cree que esa actividad de los compuestos de la presente invención actúa mediante la unión al sitio catalítico de la mTOR.

### Composiciones, medicamentos y kits

25 En la presente memoria se divulgan composiciones farmacéuticas, medicamentos y kits, los cuales comprenden, al menos, un compuesto de la invención o una sal o solvato aceptable desde el punto de vista farmacéutico de dicho compuesto y, al menos, un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Para preparar las composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos que se describen mediante esta invención, los portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico, inertes pueden ser o bien sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, píldoras y supositorios. Los polvos y los comprimidos pueden estar compuestos de desde 5 hasta 95 por ciento de principio activo. Los portadores sólidos adecuados son conocidos en la técnica, por ej., carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar o lactosa. Los comprimidos, los polvos, las píldoras y las cápsulas se pueden utilizar como formas de dosificación sólida adecuada para administración oral. Los ejemplos de portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico y los procedimientos de fabricación para varias composiciones se pueden hallar en A. Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 18° edición, (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania.

30

35 Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo soluciones acuosas o acuosas y propilenglicol para inyección parenteral o la adición de endulzantes y opacificantes para soluciones orales, suspensiones y emulsiones. Las preparaciones en forma líquida pueden incluir, además, soluciones para administración intranasal.

40 Las preparaciones en aerosol adecuadas para inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, las cuales pueden estar en combinación con un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, como por ej., un gas comprimido inerte, por ej., nitrógeno. Además, se incluyen las preparaciones en forma sólida que están destinadas a ser convertidas, poco antes del uso, a preparaciones en forma líquida para administración oral o parenteral. Estas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

45 Los compuestos de la invención pueden ser administrados, además, por vía transdérmica. Las composiciones transdérmicas pueden tomar la forma de cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones y pueden ser incluidas en un parche transdérmico de la matriz o del tipo depósito ya que son convencionales en la técnica para este propósito.

Los compuestos de esta invención pueden ser administrados, además, por vía subcutánea.

Preferiblemente, los compuestos de la invención son administrados por vía oral.

Las composiciones y los medicamentos de la presente invención pueden comprender un portador, un adyuvante, un excipiente y/o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Los portadores, diluyentes, excipientes y adyuvantes deben ser «aceptables» en términos de ser compatibles con los otros principios de la composición o el medicamento, y en general, no son dañinos para su destinatario. Los ejemplos no limitantes de los portadores o diluyentes aceptables desde el punto de vista farmacéutico son agua desmineralizada o destilada; solución salina, aceites a base de vegetales como por ej., aceite de maní, aceite de girasol, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceites de sésamo como por ej., aceite de maní, aceite de girasol, aceite de oliva, aceite de la semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de cacahuete o aceite de coco; aceites de silicona, que incluyen polisiloxanos, como por ej., polisiloxano de metilo, polisiloxano de fenilo y polisiloxano de metil fenilo; siliconas volátiles; aceites minerales como por ej., parafina líquida, parafina blanda o escualano; derivados de celulosa como por ej., metil celulosa, etil celulosa, carboximetil celulosa, carboximetil celulosa sódica o hidroxipropilmetil celulosa, alcanoles inferiores, por ejemplo etanol o isopropanol; aralcanoles inferiores; polialquilen glicoles inferiores o alquilen glicoles inferiores, por ejemplo polietilén glicol, polipropilén glicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butileno glicol o glicerina; ésteres del ácido graso como por ej., isopropil palmitato, isopropil miristato o etil oleato; polivinil pirrolidona; agar; goma tragacanto o goma acacia, y vaselina. Típicamente, el portador o los portadores formarán desde 10 % hasta 99,9 % en peso de la composición o del medicamento.

La composición y los medicamentos de la presente invención pueden estar en una forma adecuada para la administración por inyección (por ej., para administración parenteral que incluye inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa), administración por vía oral (como por ej., cápsulas, comprimidos, comprimidos oblongos y elixires, por ejemplo), administración tópica (por ej., en la forma de un ungüento, crema o loción, o una forma adecuada para administración en forma de gota ocular) o mediante inhalación intranasal (por ej., en la forma de aerosoles).

Para administración como una solución o suspensión inyectable, los diluyentes o portadores aceptables para uso parenteral no tóxicos pueden incluir, solución de Ringer, solución salina isotónica, solución salina de amortiguador de fosfato, etanol y 1,2 propilenglicol. Los procedimientos para la preparación de composiciones y medicamentos que pueden ser administrados por vía parenteral son evidentes para los expertos en la técnica, y se describen, en mayor detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science, 15° ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa.

Para la administración por vía oral, algunos ejemplos de portadores, diluyentes, excipientes y adyuvantes adecuados incluyen aceite de maní, parafina líquida, carboximetil celulosa sódica, metil celulosa, alginato de sodio, goma acacia, goma tragacanto, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, gelatina y lecitina. Además, estas formulaciones orales pueden contener agentes saborizantes y colorantes adecuados. Cuando se utiliza en forma de cápsula, las cápsulas pueden estar recubiertas con compuestos como por ej., gliceril monoestearato o gliceril estearato, los cuales retardan la desintegración. Típicamente, los adyuvantes incluyen emolientes, emulsionantes, agentes espesantes, conservantes, bactericidas y agentes amortiguadores.

Las formas sólidas para administración oral pueden contener aglutinantes aceptables en la práctica farmacéutica humana y veterinaria, endulzantes, agentes desintegrantes, diluyentes, saborizantes, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes retardadores del tiempo. Los aglutinantes adecuados incluyen goma acacia, gelatina, almidón de maíz, goma tragacanto, alginato de sodio, carboximetil celulosa o polietilén glicol. Los endulzantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartame o sacarina. Los agentes desintegrantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinil pirrolidona, goma guar, goma xantano, bentonita, ácido alginico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato de calcio, silicato de calcio o fosfato dicálcico. Los agentes saborizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de la gaulteria, saborizante de cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, zeína, goma laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfa-tocofenol, ácido ascórbico, metil parabeno, propil parabeno o bisulfito de sodio. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Los agentes retardadores del tiempo adecuados incluyen gliceril monoestearato o gliceril distearato

Las formas líquidas para administración oral pueden contener, además de los agentes anteriores, un portador líquido. Los portadores líquidos adecuados incluyen agua, aceites como por ej., aceite de oliva, aceite de maní, aceite de sésamo, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de coco, parafina líquida, etilenglicol, propilenglicol, polietilén glicol, etanol, propanol, isopropanol, glicerol, alcoholes grasos, triglicéridos, o sus mezclas.

Las suspensiones para administración oral pueden comprender, además, agentes de dispersión y/o agentes de suspensión. Los agentes de suspensión adecuados incluyen carboximetil celulosa sódica, metil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, polivinil pirrolidona, alginato de sodio o alcohol acetílico. Los agentes dispersantes adecuados incluyen lecitina, ésteres de polioxietileno de ácidos grasos como por ej., ácido esteárico, polioxietilén sorbitol mono o dioleato, estearato o laurato, polioxietilén sorbitán mono o dioleato, estearato o laurato, y similares.

Las formulaciones para administración oral pueden comprender uno o más agentes emulsionantes. Los agentes

emulsionantes adecuados incluyen agentes de dispersión como se ejemplificó anteriormente o gomas naturales como por ej., goma guar, goma acacia o goma tragacanto.

5 Las formulaciones tópicas de la presente invención pueden comprender un principio activo junto con uno o más portadores aceptables, y opcionalmente cualquier otro ingrediente terapéutico. Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semi-líquidas adecuadas para su penetración a través de la piel al sitio donde se necesita el tratamiento, como por ej., linimentos, lociones, cremas, ungüentos o pastas, y gotas adecuadas para la administración al ojo, al oído o a la nariz.

10 Las gotas, de acuerdo con la presente invención, pueden comprender soluciones o suspensiones estériles acuosas u oleosas. Estas se pueden preparar mediante la disolución del principio activo en una solución acuosa de un agente bactericida y/o fungicida y/o cualquier otro conservante adecuado, y opcionalmente incluyen un tensioactivo. La solución resultante puede ser clarificada por filtración, puede ser transferida a un recipiente adecuado y esterilizada. La esterilización se puede obtener mediante auto clave o manteniendo a 90 °C-100 °C durante media hora, o por filtración, seguido de la transferencia a un recipiente mediante una técnica aséptica. Los ejemplos de agentes bactericidas y fungicidas adecuados para la inclusión en las gotas son nitrato o acetato fenilmercúrico (0,002 %), cloruro de benzalconio (0,01 %) acetato de clorhexidina (0,01 %). Los disolventes adecuados para la preparación de una solución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

20 Las lociones, de acuerdo con la presente invención, incluyen las adecuadas para la aplicación a la piel o al ojo. Una loción ocular puede comprender una solución acuosa estéril que contiene, opcionalmente, un bactericida y puede ser preparada mediante procedimientos similares a los que se describieron anteriormente con relación a la preparación de gotas. Las lociones o los linimentos para la aplicación a la piel pueden incluir, además, un agente para apurar el secado y para enfriar la piel, como por ej., alcohol o acetona, y/o un humectante como por ej., glicerol, o aceite como por ej., aceite de ricino o aceite de cacahuete.

25 Las cremas, los ungüentos o las pastas, de acuerdo con la presente invención, son formulaciones semi-sólidas del principio activo para aplicación externa. Se pueden preparar mediante la mezcla del principio activo en forma dividida finamente o en polvo, solos o en solución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con una base grasienta o no grasienta. La base puede comprender hidrocarburos como por ej., parafina dura, blanda o líquida, glicerol, cera de abejas, un jabón metálico, un mucílago, un aceite de origen natural como por ej., almendra, maíz, cacahuete, ricino u oliva, lanolina o sus derivados, o un ácido graso como por ej., ácido esteárico u oleico junto con un alcohol como por ej., propilenglicol o macrogol.

30 Las composiciones y los medicamentos de la presente invención pueden incorporar cualquier tensioactivo adecuado como por ej., un tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico como por ej., ésteres de sorbitán o sus derivados de polioxietileno. Los agentes de suspensión como por ej., gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos como por ej., sílices silíceos, y otros ingredientes como lanolina, también se pueden incluir.

35 Las composiciones y los medicamentos de la presente invención pueden ser administrados en la forma de un liposoma. Los procedimientos adecuados para formar liposomas son conocidos en la técnica, y con relación a esto se hace referencia específica a Prescott, (Ed.), (1976), "Methods in Cell Biology", Volumen XIV, Academic Press, New York, N.Y. pág. 33 et seq.

Los principios activos complementarios como por ej., adyuvantes o modificadores de la respuesta biológica pueden ser incorporados, además, a las composiciones y a los medicamentos de la presente invención.

40 Cualquier adyuvante adecuado puede ser incluido en las composiciones o en los medicamentos de la presente invención. Por ejemplo, se puede utilizar un adyuvante a base de aluminio. Los adyuvantes a base de aluminio adecuados incluyen, pero sin estar limitados, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sus combinaciones. Otros ejemplos específicos de adyuvantes a base de aluminio que pueden ser utilizados se describen en la Patente Europea No. 1216053 y en la Patente Estadounidense No. 6.372.223. Otros adyuvantes adecuados incluyen el adyuvante incompleto de Freund y el adyuvante completo (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); AS-2 (SmithKline Beecham, Filadelfia, Pa.); sales de aluminio como por ej., gel de hidróxido de aluminio (alum) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o zinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónica o aniómicamente; polifosfacenos, microesferas biodegradables; monofosforil lípido A y quil A; aceites en emulsiones acuosas que incluyen las que se describen en la Patente Europea No. 0399843, en la Patente Estadounidense No. 7.029.678 y en la Publicación PCT No. WO 2007/006939; y/o citoquinas adicionales, como por ej., GM-CSF o interleuquina-2, -7 o -12, factor estimulante de la colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), monofosforil lípido A (MPL), toxina del cólera (CT) o su subunidad constituyente, enterotoxina termolábil (LT) o su subunidad constituyente, adyuvantes del ligando del receptor de tipo Toll como por ej., lipopolisacárido (LPS) y sus derivados (por ej., monofosforil lípido A y monofosforil lípido A 3-deacilado, muramil dipéptido (MDP) y proteína F del virus sincitial respiratorio (RSV).

Además, se describe en la presente memoria un kit que comprende una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico de, al menos, un compuesto de la invención, o una sal o solvato aceptable desde el punto de vista farmacéutico de dicho compuesto y un portador, vehículo o diluyente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

5 Otro aspecto de esta divulgación es un kit que comprende una cantidad de, al menos, un compuesto de la invención, o una sal o solvato aceptable desde el punto de vista farmacéutico de dicho compuesto y una cantidad de, al menos, un tratamiento antineoplásico y/o un agente antineoplásico mencionado anteriormente, en donde las cantidades de los dos o más ingredientes dan lugar a un efecto terapéutico deseado. Los kits como se describen en la presente memoria pueden comprender componentes para asistir en la realización de los usos descritos en la presente memoria como por ejemplo, los dispositivos de administración, los amortiguadores y/o diluyentes. Los kits pueden incluir recipientes para alojamiento de varios componentes e instrucciones para el uso de los componentes del kit en los usos que se describieron en la presente memoria.

Los kits pueden ser kits combinados.

Los kits pueden ser kits fragmentados.

Dosificaciones y vías de administración

15 Los agentes, las composiciones y los medicamentos pueden ser administrados a un destinatario mediante vías estándares, que incluyen, pero sin estar limitadas, las vías parenteral (por ej., intravenosa, intraespinal, subcutánea o intramuscular), oral, tópica o mucosal (por ej., intranasal). En algunas realizaciones, pueden ser administrados a un destinatario aisladamente o en combinación con otros agentes terapéuticos adicionales. En estas realizaciones, la administración puede ser simultánea o secuencial.

20 En general, los agentes, las composiciones y los medicamentos pueden ser administrados de una manera compatible con la vía de administración y las características físicas del destinatario (que incluye el estado de salud) y de una manera tal que se induzca el efecto deseado (es decir, eficaz terapéuticamente, inmunógeno y/o protector). Por ejemplo, la dosificación apropiada puede depender de una variedad de factores que incluyen, pero sin estar limitados, las características físicas de un sujeto (por ej., la edad, el peso, el sexo), si el agente, la composición o el medicamento se utiliza como único agente o como tratamiento adyuvante, la progresión (es decir, el estado patológico) del cáncer que se trata, y otros factores fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

25 Varias consideraciones generales cuando se determina una dosificación apropiada de los agentes, de las composiciones y de los medicamentos se describen, por ejemplo, en Gennaro et al. (Eds.), (1990), "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, USA; and Gilman et al., (Eds.), (1990), "Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics", Pergamon Press.

30 Una ventaja sorprendente de la presente invención es que los compuestos de la invención reflejan, en general, una baja toxicidad. Por ejemplo, el MPL tiene toxicidad de única dosis en exceso de 2000 mg por kg de peso corporal. Como tal, un agente, una composición o un medicamento para uso en la presente invención puede ser administrado a un paciente en forma de única dosis de una cantidad de hasta y que incluye 2000 mg de componentes activos por kg de peso corporal. Además, otra ventaja sorprendente de utilizar los compuestos de la presente invención para el tratamiento del cáncer es, en general, la alta tolerancia clínica de los compuestos. Por ejemplo, una dosificación de 1000 mg de MPL por kg de peso corporal por 24 horas es bien tolerada en los mamíferos. Como tal, un agente, una composición o un medicamento para uso en la presente invención puede ser administrado a un paciente en una cantidad de hasta y que incluye 1000 mg de componentes activos por kg de peso corporal cada 24 horas.

40 En general, una dosis eficaz se espera que sea en el intervalo de 0,0001 mg hasta 1000 mg de componentes activos por kg de peso corporal cada 24 horas; típicamente, 0,001 mg hasta 750 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; 0,01 mg hasta 500 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; 0,1 mg hasta 500 mg cada kg de peso corporal cada 24 horas; 0,1 mg hasta 250 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; o 1,0 mg hasta 250 mg por kg de peso corporal cada 24 horas. Más típicamente, un intervalo de dosis eficaz se espera que sea en el intervalo de 1,0 mg hasta 200 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; 1,0 mg hasta 100 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; 1,0 mg hasta 00 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; 1,0 mg hasta 25 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; 5,0 mg hasta 50 mg por kg de peso corporal cada 24 horas; 5,0 mg hasta 20 mg por kg de peso corporal cada 24 horas o 5,0 mg hasta 15 mg por kg de peso corporal cada 24 horas.

45 Por ejemplo, una dosis preferida puede ser 10 - 100 mg del compuesto de la invención por kg de peso corporal cada 24 horas. Además, una dosis preferida puede ser 50 mg del compuesto de la invención por kg de peso corporal cada 24 horas.

Además, será evidente para un experto en la técnica que la cantidad óptima y el espaciado de las dosis individuales puede ser determinado por la naturaleza y la extensión del estado de la enfermedad o la afección que se trata, la forma,

la vía y el sitio de administración, y la naturaleza del sujeto particular que se trata. Las dosis óptimas se pueden determinar mediante el uso de técnicas convencionales.

5 En muchas instancias (por ej., aplicaciones preventivas), puede ser conveniente tener varias o múltiples administraciones de un agente, una composición o un medicamento de la presente invención el cual puede, por ejemplo, ser administrado 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces. Las administraciones pueden ser desde uno a doce intervalos semanales, y en ciertas realizaciones desde uno a cuatro intervalos semanales. Además, se contempla una nueva administración periódica.

Además, será evidente para un experto en la técnica que el curso óptimo de la administración puede ser determinado mediante el curso convencional de las pruebas de determinación del tratamiento.

10 Cuando dos o más entidades (por ej., agentes o medicamentos) se administran a un sujeto «en conjunto», se pueden administrar en una composición simple al mismo tiempo, o en composiciones separadas al mismo tiempo, o en composiciones separadas a la vez que separadas en el tiempo.

15 Ciertas realizaciones de la presente invención involucran la administración de los agentes, las composiciones o los medicamentos en múltiples dosis separadas. En consecuencia, los medios para el tratamiento profiláctico y terapéutico que se describen en la presente memoria abarcan la administración de múltiples dosis separadas a un sujeto, por ejemplo, durante un periodo de tiempo definido. En consecuencia, en algunas realizaciones, los medios incluyen la administración de una dosis de cebado, la cual puede ser seguida de una dosis de estímulo. El estímulo puede ser con el fin de una revacunación. En varias realizaciones, el agente, la composición o el medicamento se administran, al menos una vez, dos veces, tres veces o más.

20 Los agentes, las composiciones y los medicamentos pueden ser administrados, en general, en una cantidad eficaz para obtener un fin determinado. Más específicamente, pueden ser administrados en una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico, lo cual significa una cantidad eficaz para prevenir el desarrollo de, o para aliviar los síntomas existentes de, una enfermedad o afección específica. La determinación de las cantidades eficaces está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Por ejemplo, una dosis eficaz desde el punto de vista terapéutico de los  
25 agentes, las composiciones y los medicamentos puede ser estimada inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Por ejemplo, una dosis puede ser formulada en modelos animales para obtener un intervalo de concentración de circulación que incluye la CI50 según se determina en el cultivo celular. Dicha información puede ser utilizada para determinar, de manera precisa, las dosis útiles en los seres humanos y otros sujetos mamíferos.

30 Una dosis eficaz desde el punto de vista terapéutico se refiere a esa cantidad del agente, de la composición o del medicamento para prevenir el desarrollo de síntomas, aliviar los síntomas y/o la supervivencia del sujeto en tratamiento. La toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes, las composiciones y los medicamentos pueden ser determinadas mediante ensayos farmacéuticos estándares en cultivos celulares, y/o animales experimentales (por ej., por determinación de la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y el DE50 (la dosis eficaz desde el punto de vista terapéutico en el 50 % de la población)). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico el cual puede ser expresado como la relación entre DL50 y DE50. Los agentes, las composiciones y los  
35 medicamentos que exhiben altos índices terapéuticos son los preferidos. Los datos obtenidos de dichos ensayos de cultivo celular y/o de los estudios animales pueden ser utilizados para formular un intervalo de dosis para uso en seres humanos u otros mamíferos.

40 La dosis de estos compuestos se encuentra, preferiblemente, dentro de un intervalo de concentraciones de circulación que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo según la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser seleccionadas sin dificultad por un médico individual en vista de la afección del sujeto (ver, por ejemplo, Fingl et al., (1975), in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 pág. 1). La cantidad y el intervalo de la dosis pueden ser ajustados de forma individual para proporcionar niveles plasmáticos del agente activo suficientes para obtener y mantener los efectos terapéuticos deseados y/o la concentración efectiva mínima (CEM). Las dosis necesarias para obtener la CEM dependerán de la vía de administración y de otras características individuales. Los  
45 bioensayos y/o los ensayos de HPLC se pueden utilizar para determinar las concentraciones plasmáticas.

Los intervalos de dosis pueden ser determinados, además, mediante el uso del valor de CEM. En general, los agentes, las composiciones y los medicamentos pueden ser administrados mediante el uso de un régimen el cual mantiene los niveles plasmáticos por encima de la CEM durante entre el 10 %-90 % del tiempo, preferiblemente entre el 30 %-90 %, y más preferiblemente entre el 50 %-90 %. En las realizaciones donde se utiliza la administración local o la recaptación selectiva, la concentración local efectiva del medicamento puede no estar relacionada con la concentración plasmática.

Los compuestos que se describen en la presente memoria puede ser útiles, además, en combinación (administrados juntos o de forma secuencial) con uno o más tratamientos antineoplásicos como por ej., terapia de radiación, y/o uno o  
55 más agentes antineoplásicos que se seleccionan del grupo que consiste de agentes citostáticos, agentes citotóxicos

(como por ejemplo, pero sin estar limitados, agentes interactivos de ADN (como por ej., cisplatino o doxorubicina)); taxanos (por ej., taxotere, taxol); inhibidores de topoisomerasa II (como por ej. etoposide); inhibidores de topoisomerasa I (como por ej., irinotecan (o CPT-11), camptostar o topotecan); agentes de interacción de tubulina (como por ej., paclitaxel, docetaxel o los epotilones); agentes hormonales (como por ej., tamoxifeno); inhibidores de timidilato sintasa (como por ej., 5-fluorouracilo); anti-metabolitos (como por ej., metotrexato); agentes alquilantes (como por ej., temozolomida (TEMODAR (TM) de Schering-Plough Corporation, Kenilworth, New Jersey), ciclofosfamida); inhibidores de farnesil proteína transferasa (como por ej., SARASAR (TM)(4~ [2-[4-[(11 R)-3,10-dibromo-8-cloro-6,11-dihidro-5H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2- b]piridin- 11-il-]-1-piperidinil]-2-oxoetil]-1-piperidin carboxamida, o SCH 66336 de Schering-Plough Corporation, Kenilworth, New Jersey), tipifamib (Zamestra® o R115777 de Janssen Pharmaceuticals), L778.123 (un inhibidor de farnesil proteína transferasa de Merck & Company, Whitehouse Station, New Jersey), BMS 214662 (un inhibidor de farnesil proteína transferasa de Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals, Princeton, New Jersey); inhibidores de la transducción de señal (como por ej., Iressa (de Astra Zeneca Pharmaceuticals, Inglaterra), Tarceva (inhibidores de EGFR quinasa), anticuerpos a EGFR (por ej., C225), GLEEVEC (TM) (inhibidor de C-abl quinasa de Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, New Jersey); interferones como por ej., intrón (de Schering-Plough Corporation), Peg-Intrón (de Schering-Plough Corporation); combinaciones de terapia hormonal; combinaciones de aromatasa; ara-C, adriamicina, citoxan, y gemcitabina.

#### Sujetos

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

La presente invención se describirá, a continuación, con referencia a los ejemplos específicos, los cuales no deben ser interpretados como de una manera limitante.

#### Ejemplos

##### 25 Materiales y procedimientos

##### Líneas celulares

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

##### Ensayos de proliferación celular

La proliferación celular se evaluó mediante el uso del ensayo de sulforhodamina B (SRB). Las células sembradas en una placa de 96 pocillos (2.000-3.000 células/pocillo) se trataron con MPL (0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 mmol/l) durante 72 horas. Las células se fijaron, se lavaron y se colorearon con 100 ml de 0,4 % (p/v) de SRB disuelto en 1 % de ácido acético. El tinte no ligado se eliminó mediante cinco lavados con 1 % de ácido acético antes del secado al aire. El SRB ligado se solubilizó con 100 ml de base Tris 10 mM (pH 10,5) y se leyó la absorbancia a 570 nm. Exactamente el mismo procedimiento se utilizó para evaluar el MPL-SO2. Ambos agentes se disolvieron en etanol y se diluyeron con medios para dar las concentraciones finales necesarias para los ensayos de cultivo celular.

##### Ensayos de viabilidad celular

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

##### Ensayo de formación de colonias

Para el ensayo de formación de colonias, 5x10<sup>6</sup> células, como por ej., las células OVCAR-3 o A2780 se plaquearon en bandejas Petri de 100 mm y se dejaron unir durante toda la noche. Los medios se aspiraron y las células exponencialmente en desarrollo se incubaron con varias concentraciones de MPL durante 72 horas. En este punto, el medio se aspiró, las bandejas se lavaron con PBS y el medio exento de medicamento se agregó a cada placa. Los

medios se cambiaron dos veces a la semana durante 3 semanas. Después de esto, las placas se lavaron suavemente con PBS y las células se fijaron con 100 % de etanol y se colorearon con una solución al 0,5 % de violeta cristal filtrado. Las colonias que consisten de más de 50 células se contaron en un microscopio invertido.

#### Análisis del ciclo celular

5 El efecto del MPL sobre el ciclo celular se determinó mediante el uso de los protocolos y procedimientos del análisis de citometría de flujo. En breve, 0,7x10<sup>6</sup> millones de células se sembraron en matraces de 25 cm<sup>3</sup> y se dejaron adherir durante toda la noche, se trataron con MPL durante 24 o 48 horas. Las células se recolectaron con tripsinización y se agruparon con las células que flotan en el medio. Las suspensiones celulares se centrifugaron, se lavaron con PBS y se fijaron con metanol. A continuación, las células se lavaron, se volvieron a suspender en yoduro de propodio y  
10 ribonucleasa A en PBS durante 30 min. a temperatura ambiente y se analizaron por citometría de flujo (Becton Dickinson FACSort).

#### Análisis por transferencia Western

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

20 En experimentos adicionales, después del tratamiento con las concentraciones indicadas de MPL, los lisados celulares se prepararon y se sondearon con anticuerpos para c-Myc, ciclina D1, ciclina E, cdk2, cdk4, IGF-1R (Cell Signaling Technology) y Santa Cruz Biotechnology, Australia). La carga de proteínas comparable en el gel se verificó mediante un nuevo sondeo de las transferencias con un anticuerpo GAPDH (Sigma-Aldrich, Sidney, Australia).

#### Experimentos *in vivo*

25 Se adquirieron ratones hembras nude (6 semanas de vida) de Biological Resources (Facultad de Medicina, Universidad de New South Wales). Una aprobación de ética animal institucional cubrió todos los procedimientos que se llevaron a cabo sobre ratones. En breve, se inyectaron s.c. de células OVCAR-3 de crecimiento en fase logarítmica de 2,53106, dentro del flanco izquierdo de cada ratón. Los animales se pesaron una vez a la semana mientras que los volúmenes de sus tumores se determinaron dos veces a la semana. El crecimiento del tumor se monitoreó mediante mediciones calibradas de los diámetros ortogonales, y el volumen estimado del tumor se calculó basado en la fórmula 1/2 (longitud3 x ancho2) donde el ancho es el más corto de las dos mediciones ortogonales. Sobre la base de la aprobación de ética  
30 profesional, los ratones se sacrificaron antes de que el volumen alcanzara 500 mm<sup>3</sup>. El tratamiento se inició el día 8 posterior a la inyección de célula tumoral cuando los ratones se aleatorizaron y se asignaron a tratamiento o al grupo control (6 por grupo). Se suspendió monepantel en 0,5 % (p/v) de hidroxiperoxi metilcelulosa estéril (HPMC). El medicamento se administró i.p 3 veces a la semana a 25 o 50 mg/kg. El grupo control se trató con vehículo estéril (0,5 % de HPMC). Los ratones se trataron durante un periodo de 3 semanas. Veinticuatro horas posteriores a la última  
35 administración del medicamento, los ratones se sacrificaron y sus tumores se extrajeron y se congelaron a -80 °C hasta el análisis.

40 En experimentos alternativos, el tratamiento se inició el día 8 posterior a la inyección de célula tumoral cuando los ratones se aleatorizaron y se asignaron a uno de los grupos tratados con MPL o vehículo (5-6 ratones por grupo). El MPL se suspendió en hidroxiperoxi metilcelulosa (0,5 % p/v de HPMC), se esterilizó mediante un baño de ultrasonidos y se administró cada dos días o bien, por vía intraperitoneal (i.p.), o por vía oral como alimentación forzosa (100 ml). En el primer ensayo piloto, el medicamento se administró i.p. a 2,5 o 25 mg/kg de peso corporal, tres veces a la semana durante 2 semanas. Después del resultado, en el siguiente conjunto de animales, la dosis se incrementó hasta 25 y 50 mg/kg, tres veces a la semana. En el último estudio piloto (tercero), los ratones se trataron por vía oral. Las dosis administradas fueron 50 y 100 mg/kg tres veces a la semana. En todos estos ensayos, los ratones en los grupos control  
45 recibieron un volumen similar de vehículo (0,5 % de HPMC). Se realizó la histología inmunohistoquímica del tumor sobre porciones del tumor fijadas en formalina, de acuerdo con los procedimientos estándares.

#### Análisis estadístico

50 Todos los datos se informaron como errores de la media ± estándar (S.E.M:) a partir de, al menos, dos experimentos independientes. Las diferencias en el volumen del tumor entre el grupo tratado con MPL y el grupo control se analizaron mediante el uso de ANOVA univoca con prueba post hoc de Dunnett. Las variables cuantitativas se compararon mediante el uso de la prueba t de Student. La diferencia estadística significativa se definió en P < 0,05.

#### **Resultados**

MPL inhibe la proliferación celular

- 5 El efecto del MPL se examinó sobre el desarrollo de las líneas celulares del cáncer de ovario de OVCAR-3, A2780 y SKOV-3. Al emplear el ensayo SRB, se examinó el efecto del MPL sobre la proliferación celular. El MPL inhibió la proliferación de las células OVCAR-3, A2780 y SKOV-3 de una manera dependiente de la concentración con valores de CI50 de 6,3, 10,0 y 29,3, respectivamente, de acuerdo con la tabla 1. Es evidente a partir de estos resultados que las líneas celulares de cáncer de ovario son sensibles a los efectos anti-proliferativos del MPL. Las células SKOV-3 fueron las menos sensibles. El MPL-SO2 se ensayó, además, de manera similar mediante el uso del ensayo de proliferación de SRB. Se halló que el MPL-SO2 es tan potente como el MPL. El MPL-SO2 redujo la viabilidad del desarrollo de las líneas celulares cancerosas e inhibió la proliferación celular. Los valores CI50 para MPL-SO2 se presentan en la tabla 1.
- 10 El efecto inhibitor del MPL sobre la proliferación celular se ensayó, además, sobre un rango de células, como por ej., células de mama, de próstata y de mesotelioma. Los resultados se presentan en la tabla 1. Los resultados adicionales se presentan en la tabla 2.

Tabla 1: Valores CI50 para MPL y MPL-SO2 (tratamiento *in vitro* de 72 horas, ensayo SRB)

Líneas celulares	Tipo de cáncer	CI50 (µM)	
		MPL	MPL-SO2
OVCAR-3	Cáncer de ovario	6,3	5,5
A2780	Cáncer de ovario	10,0	4,2
SKOV-3	Cáncer de ovario	29,3	26
IGROV-1	Cáncer de ovario	6,1	-
1A9	Cáncer de ovario	1,8	4,8
T47-D	Cáncer de mama	5,7	-
MDA-MB-231	Cáncer de mama	24,0	23,6
MCF-7	Cáncer de mama	-	7,3
PET	Mesotelioma	26,3	-
YOU	Mesotelioma	23,1	-
PC-3	Cáncer de próstata	21,6	-
DU-145	Cáncer de próstata	23,5	-
U87	Glioblastoma	26,2	20,5
HUVEC	Células endoteliales de la vena umbilical humana	87,8	47,8
CHO	Ovario de hámster chino	-	73,7
HEK	Riñón embrionario humano	50,5	-

15

Tabla 2: Los valores CI50 para MPL y MPL-SO2 en la represión de la proliferación de varias líneas celulares de cáncer.

Líneas celulares	Tipo de cáncer	CI50 ( $\mu\text{M}$ )	
		MPL	MPL-SO2
OVCAR-3	Cáncer de ovario	6.3 $\pm$ 0.8 ***	5.5 $\pm$ 1.3 ***
A2780	Cáncer de ovario	10 $\pm$ 3.8 **	4,2 $\pm$ 2.1 **
SKOV-3	Cáncer de ovario	31.18 $\pm$ 0.76***	26
IGROV-1	Cáncer de ovario	4.4 $\pm$ 0.27**	4.4 $\pm$ 1.5**
1A9	Cáncer de ovario	2.5 $\pm$ 0.45**	3.42 $\pm$ 0.1**
T47-D	Cáncer de mama	5.3 $\pm$ 0.003**	10.2 $\pm$ 0.6**
MDA-MB-231	Cáncer de mama	23.8 $\pm$ 0.2**	21.6 $\pm$ 7.5 ***
MCF-7	Cáncer de mama	15.4 $\pm$ 1.1**	8.0 $\pm$ 0.7**
PET	Mesotelioma	26	-
YOU	Mesotelioma	23	-
PC-3	Cáncer de próstata	21	-
DU-145	Cáncer de próstata	23	-
SW-876	Liposarcoma	14,57	-
HT-1080	Fibrosarcoma	17,16	-
U87	Glioma	18 $\pm$ 7.1 **	20,5 $\pm$ 1.0 **
LN-18	Glioma	9.38 $\pm$ 0.79**	6,64 $\pm$ 0.71 **
T98G	Glioma	18.2 $\pm$ 0.61	25.4 $\pm$ 0.28**
U251	Glioma	17 $\pm$ 1.2**	-
HCT-116	Cáncer colorrectal	10.5 $\pm$ 0.02**	22.5 $\pm$ 5.7**
HT-29	Cáncer colorrectal	5.86 $\pm$ 0.2**	2.75 $\pm$ 0.7**
HT-29 5m11	Cáncer colorrectal	10,4	21,7
HeLa	Epitelial (adenocarcinoma)	15.8 $\pm$ 0.3**	18.2 $\pm$ 2.6**
HUVEC	Células endoteliales de la vena umbilical humana	87	47
CHO	Ovario de hámster chino	34.61 $\pm$ 0.789***	73,7 $\pm$ 6.0 **
HEK	Riñón embrionario humano	34.57 $\pm$ 0.86**	-
3T3	Fibroblasto	12.41 $\pm$ 0.37**	11,2 $\pm$ 1.1 **
HaCat	Queratinocito	21.2 $\pm$ 3.2**	42.68 $\pm$ 8.0**
Astroцитos del feto humano	Astroцитos	85,55 $\pm$ 2.7**	-
No star = una determinación, ** = dos repeticiones, *** = tres repeticiones			

Tabla 3:

ES 2 757 598 T3

	AAD	AHC #	MW	Fórmula	CI50 $\mu$ M OVCAR-3	CI50 $\mu$ M A2780	CI50 $\mu$ M CHO	CI50 $\mu$ M CHO
1	450	0942648	382,77	C18H14ClF3N2O2	23,85 6 1,45	33,5 $\pm$ 8,5	45,87	96,5
2	907	2000020	416,32	C19H14N2O2F6	18.9 6 4.1	27,65 $\pm$ 7,15	169	55,18
3	970	2000114	432,32	C19H14N2O3F6	>100	>100	142	139,8
4	1154	2001354	433,21	C1SH13N2O3F3Cl2	20.5 6 0.5	28,0 $\pm$ 4,5	34,8	61,1
5	1336	2017686	479,20	C18H12N2O3F5Br	14,65 6 1,25	17,0 $\pm$ 1,2	31,8	61,3
6	1470	2033757	468,30	C19H12N2O3F8	12.9 6 0.3	19,5 $\pm$ 4,1	32,2	74,0
7	004	2060021	416,75	C18H13N2O3F4Cl	18,58 6 2,4	27,3 $\pm$ 0,5	57,3	93,0
8	2009	2062412	416,75	C18H13N2O3F4Cl	34.3 6 4.3	75,9 $\pm$ 1,9	198	129,9
MPL-(S)	1566	2082782	473,39	C20H13N3O2F6S	7.9 6 0.9	11,3 $\pm$ 0,9	34,61	65,0
MPL-(R)	2224	2102224	473,39	C20H13N3O2F6S	8.0 6 0.7	14,75 $\pm$ 0,45	23,4	108,8

Las OVCAR-3 A2780 son células de cáncer de ovario epitelial humano; CHO = células de ovario de hámster chino, HUVEC = células endoteliales de la vena umbilical humana

AAD

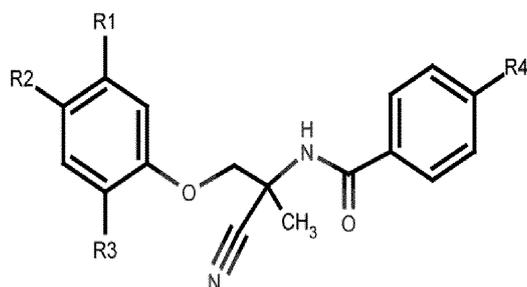


Tabla 4: Derivados de amino acetonitrilo (AAD) de acuerdo con la tabla 3

AAD	R1	R2	R3	R4
1566 (MPL)	CN	H	CF <sub>3</sub>	SCF <sub>3</sub>
2105 (MPL-SO)	CN	H	CF <sub>3</sub>	SO CF <sub>3</sub>
4670 (MPL-SO <sub>2</sub> )	CN	H	CF <sub>3</sub>	SO <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>

450	H	H	Cl	CF <sub>3</sub>
907	H	H	CF <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>
970	H	H	CF <sub>3</sub>	OCF <sub>3</sub>
1154	Cl	H	Cl	OCF <sub>3</sub>
004	F	H	Cl	OCF <sub>3</sub>
2009	H	F	Cl	OCF <sub>3</sub>
1336	F	F	Br	OCF <sub>3</sub>
1470	F	F	CF <sub>3</sub>	OCF <sub>3</sub>

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

- 5 De acuerdo con los resultados que se muestran en la tabla 3, la relación de los valores CI50 (célula normal / célula cancerosa) para los AAD 907, 1336, 1470 y 2224 (MPL-(R)) muestran actividad particularmente alta. Además, se halló que los AAD 2224 (MPL-(R)) y AAD 1566 (MPL-(S)) son equipotentes. Se observa que el MPL-(R) de enantiómero (R) ha mostrado, previamente, no tener actividad antihelmíntica.

- 10 En breve, el MPL y el MPL-SO2 se ensayaron *in vitro* contra un amplio intervalo de líneas celulares cancerosas con características de la enfermedad en gran parte diferentes. Para estudios detallados adicionales, se eligieron las líneas celulares del cáncer de ovario humano OVCAR-3 y A2780. Además, se eligieron las células epiteliales de la superficie del ovario humano normales (HOSE) y se cultivaron en presencia del MPL (0, 5, 10, 25, 50 y 100 µM) durante 72 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante el uso del ensayo de azul de tripano (figura 9). De manera similar, se investigó el efecto del MPL sobre el desarrollo de las células epiteliales, endoteliales, embrionarias y fetales normales (figura 10)
- 15 mientras que se evaluó la proliferación celular mediante el uso del ensayo de SRB (figura 11). Las células control (tratadas con vehículo) se tomaron para presentar el 100 % de proliferación y los grupos tratados con MPL se expresan como porcentaje de control ± SEM. Cada concentración de medicamento se ensayó por cuadruplicado y cada experimento se repitió, al menos, dos veces. Para las comparaciones estadísticas, cada grupo tratado con el medicamento se comparó con el grupo control mediante el uso de la prueba t de Student. Para examinar el efecto del medicamento dependiente de la concentración, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA). Los valores P son: \* = < 0,05; \*\* < 0,01 y \*\*\* = < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001. Los resultados que se presentan en la tabla 2 revelan que el MPL ejerce una
- 20 alta actividad antiproliferativa en las líneas celulares cancerosas, mientras que las células normales están mucho menos afectadas. A fin de descubrir si el efecto del MPL está mediado a través del receptor de acetil colina nicotínico y, en particular, el subtipo nACHR7, las células se trataron previamente con antagonistas y se expusieron al MPL (figura 12).

- 25 También se presentan los resultados obtenidos para el MPL-SO2. Se puede ver que el MPL-SO2 actúa de manera similar al medicamento principal MPL. El intervalo de los valores CI50 son muy cercanos e indican que el MPL-SO2 es tan efectivo como el MPL en la represión de la proliferación de células cancerosas (tabla 2).

#### MPL inhibe la formación de colonias

- 30 Para investigar si el MPL impide, además, la integridad reproductiva y la capacidad de las líneas celulares para establecer colonias, se investigó la actividad clonogénica de las células expuestas a MPL. Después de 72 horas de exposición a varias concentraciones de MPL, las células se lavaron y se incubaron en medios exentos de medicamentos durante 2 semanas. Se halló que el MPL impide profundamente la formación de colonias por parte de estas células. Las concentraciones más altas de MPL provocaron la pérdida casi completa de la capacidad clonogénica (figura 2).

- 35 Para determinar el efecto del MPL sobre la integridad y la capacidad de la célula para liberarse de los efectos del medicamento después de la exposición y el retiro del medicamento, las células se incubaron con MPL (0, 5, 10, 25 µM) durante 72 horas, se lavaron con PBS, se transfirieron a placas de agar, se cultivaron con medio de crecimiento y se incubaron en condiciones estándares durante 2 semanas. Las células se fijaron con 100 % de metanol y se colorearon con 1 % de violeta cristal. Las colonias (clúster de células superior a 50) se contaron en un microscopio (magnificación 3,5). El número de colonias que se contaron para diferentes grupos experimentales se expresa como porcentaje del control (figura 15). Estos resultados muestran la inhibición dependiente de la concentración de la formación de colonias
- 40

por parte del MPL:

MPL detiene el ciclo celular a través de la regulación descendente de la expresión de ciclinas y quinasas dependiente de ciclinas.

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

MPL detiene el ciclo celular a través de la regulación descendente de la expresión de ciclinas y quinasas dependiente de ciclinas que provoca la inducción de la escisión de PARP-1.

15 Para hallar el mecanismo a través del cual el MPL inhibe la proliferación celular y la formación de colonias, se examinó el efecto del MPL sobre el ciclo celular por medio de la citometría de flujo (FACS). Se halló que el MPL interfiere con la progresión del ciclo celular (figura 22). En las células expuestas al MPL, el ciclo celular se detuvo en la fase G1 en una concentración y de una manera dependiente del tiempo. La acumulación de células en la fase G1 estuvo acompañada de la declinación aguda del porcentaje de células en las fases S y G2-M. Para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la detención del ciclo celular inducido por MPL, se examinó la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular cdk2, cdk4, ciclinas A y E. Las células tratadas con MPL expresaron niveles más bajos de cdk2, cdk4, ciclina E y ciclina A (figuras 4 y 16).

MPL induce la escisión de PARP-1

25 Para investigar si la muerte celular inducida por MPL involucra la escisión de PARP, se llevó a cabo el análisis por transferencia Western de los lisados de las células tratadas con MPL para PARP-1 y PARP-1 escindido. La escisión de PARP-1 promueve la apoptosis mediante la prevención de la supervivencia inducida por la reparación de ADN. La PARP ayuda a las células a mantener su viabilidad y, de este modo, la escisión de PARP facilita el desmontaje celular y sirve como marcador de las células que experimentan apoptosis. La figura 5 muestra que la PARP fue escindida en las células tratadas con MPL.

El MPL induce la escisión de PARP

30 El análisis por transferencia Western de los lisados celulares que se prepararon a partir de las células OVCAR-3 y A2780 tratadas con MPL muestra la escisión muy inducida de la PARP lo que representa la muerte celular (figura 18).

El MPL reduce los niveles celulares de ATP

Como se describe en las figuras 19A y 19B, el tratamiento de las células OVCAR-3 o A2780 con MPL origina una reducción en los niveles de ATP hallados en la célula.

35 El MPL induce la autofagia

La figura 6 muestra que el tratamiento de las células con MPL provoca la formación de vacuolas que indican que el MPL puede estar induciendo la autofagia en estas células. La figura 7 muestra que el tratamiento con MPL reduce la relación celular de ADP/ATP, lo cual es otro indicador de la autofagia celular.

El MPL reprime la velocidad del crecimiento de xenoinjertos s.c. en ratones nude

40 Las figuras 20-22 muestran la prueba *in vivo* del MPL en ratones nude. Los ratones que portan los tumores de OVCAR-3 se trataron o bien, primero i.p. o, de acuerdo con el último experimento, por vía oral. Los resultados obtenidos revelan la actividad de las dosis administradas y, en particular, la dosis de 50 mg/kg (tanto i.p. como oral) que retarda profundamente el crecimiento del tumor en estos animales. La histología del tumor reveló las áreas masivas de la muerte celular tumoral (figura 23).

45 La inhibición de la proliferación celular acoplada con la represión de la formación de colonias, y los resultados *in vivo* muestran un efecto regulador del crecimiento para MPL. La interferencia de MPL se muestra con la progresión del ciclo celular a través de la reducción de la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo A y E2 junto con sus quinasas cdk2 y cdk4. En la célula normal, la transición de una fase a otra ocurre de manera ordenada bien regulada por varias

5 proteínas. Las quinasas dependientes de ciclina (CDK) son las proteínas reguladoras claves que se activan en puntos específicos del ciclo celular, desempeñando de este modo una función en la progresión del ciclo celular. Estas requieren ciclinas diferentes a diferentes fases del ciclo. Las ciclinas A, D y E son necesarias para la transición de G1 y de G1 a la fase 1 del ciclo celular. De las diversas CDK identificadas hasta ahora, la CDK2 y la CDK4 parecen esenciales para la  
 5 entrada en la transición de G1 y G1-S. Las ciclinas A y E se enlazan a la CDK2 mientras que la ciclina D se enlaza a las CDK4 y CDK6. El cáncer es una de las diversas enfermedades consideradas como un fenómeno relacionado con el ciclo celular.

10 Los resultados que se presentan en las figuras 20-22 muestran la actividad de MPL en la represión del crecimiento del tumor s.c. en ratones nude hembras. El ensayo inicial reveló la actividad dependiente de la dosis de la administración i.p. de MPL. La dosis de 25 mg/kg fue particularmente eficaz. Sobre esta base, el siguiente ensayo se realizó mediante el uso de dosis de 25 y 50 mg/kg en las mismas condiciones que antes.

15 La dosis de 50 mg/kg fue más eficaz en el retardo del crecimiento del tumor en estos animales. Como un agente antiparasitario, el MPL ha mostrado ser eficaz por vía oral en un número de modelos animales. Se ensayó la actividad terapéutica oral de las dosis de 50 y 100 mg/kg de MPL. En los tres ensayos piloto, el MPL se preparó en 0,5 % de HPMC y se administró en forma de una suspensión. El examen del tejido del tumor de estos ensayos *in vivo* reveló las áreas con necrosis extensa en los tumores tratados con MPL (figura 23).

Los efectos observados no están limitados al cáncer de ovario, como se muestra en las tablas 1 y 2, y el MPL reprime, de manera eficaz, la proliferación celular *in vitro* en una variedad de líneas celulares que representan varios cánceres que incluyen: glioma, próstata, mama, mesotelioma, liposarcoma, fibrosarcoma (ver las tablas 1 y 2).

20 Otra observación importante es la actividad del MPL contra las líneas celulares quimio-resistentes. Las células quimio-resistentes de ovario, las células resistentes a temozolimide de glioma y las células resistentes a tamoxifeno del cáncer de mama fueron todas sensibles a la acción antiproliferativa del MPL.

En conclusión, los resultados muestran que en las líneas celulares cancerosas, el MPL y posiblemente sus metabolitos y análogos (AAD):

- 25 1- Inhiben la proliferación celular;
- 2- La inhibición inducida por MPL no se ve ni positiva ni negativamente afectada por el tratamiento previo con agonistas o antagonistas nicotínicos, lo que indica que el modo de acción no está mediado por el receptor de nicotina;
- 3- Inhiben la formación de colonias;
- 4- Detienen el ciclo celular (fase G1);
- 30 5- Regula de manera descendente las proteínas reguladoras del ciclo celular (Cdk2, Cdk4, ciclina A, ciclina E);
- 6- Bloquean la incorporación de timidina en la célula y, de este modo, inhiben la síntesis de ADN;
- 7- Reducen los niveles celulares de ATP;
- 8- Originan la autofagia progresiva según se confirma por la conversión de LC3B-I en LC3B-II. La autofagia fue microscópicamente clara en ambas líneas celulares de cáncer de ovario y glioma;
- 35 9- El MPL induce, además, la escisión de PARP-1 y, de este modo, la muerte celular,
- 10- Esto se confirma mediante datos *in vivo* que muestran la represión dependiente de la dosis de los tumores en ratones nude que portan tumores s.c.;
- 11- Ambas vías de administración i.p. y oral fueron eficaces.

Es más, el MPL inhibe la proliferación de las células resistentes a alguna quimioterapia estándar.

40 mTOR y autofagia

Otro aspecto de la presente solicitud es la función de autofagia en el cáncer y en la enfermedad neurodegenerativa. En las células neuronales con apoptosis anómala rápida que originan la neurodegeneración, la autofagia es útil como un mecanismo para proteger las neuronas de la muerte celular acelerada.

5 La autofagia o la autodigestión celular es una vía celular involucrada en la degradación de proteínas y orgánulos, con un número sorprendente de conexiones con la enfermedad y la fisiología humana. Por ejemplo, la disfunción autofágica está vinculada con el cáncer, la neurodegeneración, la infección microbiana y el envejecimiento. Paradójicamente, si bien la autofagia es, esencialmente, un proceso protector para la célula, también puede desempeñar una función en la muerte celular en células cancerosas.

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

10 La autofagia, la principal vía de degradación para los orgánulos y las proteínas de larga vida, es esencial para la supervivencia de las neuronas. La creciente evidencia ha implicado a la autofagia defectuosa en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas importantes, en particular, la enfermedad de Alzheimer (EA). Los hallazgos de los estudios revisados indican que la autofagia es alterada en la etapa temprana de la enfermedad, y la disfunción en la autofagia puede desempeñar una función importante en el proceso patológico de la EA.

15 La autofagia protege a las células del daño que provoca la neurodegeneración.  
mTOR / autofagia en enfermedades neurodegenerativas.

#### Enfermedad de Alzheimer

20 Se cree que la acumulación de Abeta y Tau originan o contribuyen, directamente, a los déficits cognitivos progresivos característicos de la enfermedad de Alzheimer. Se ha mostrado que la mTOR puede desempeñar una función en la neurodegeneración inducida por Abeta y Tau.

25 La vía mTOR desempeña una función central en el control de la homeostasis de la proteína y, por lo tanto, en las funciones neuronales. En verdad, la señalización de mTOR regula las diferentes formas de aprendizaje y memoria. La rapamicina regula los déficits cognitivos y alivia la patología de Abeta y Tau al aumentar la autofagia. De manera similar, varios componentes de la señalización de mTOR pueden ser biomarcadores potenciales del desequilibrio cognitivo en el diagnóstico clínico de la EA. De este modo, a través del control de la degradación de las proteínas lisosomales en el mecanismo de la autofagia, se anticipa que los agentes relacionados con la mTOR (como por ej., MPL) son agentes terapéuticos importantes para la EA.

#### Enfermedad de Huntington

30 La enfermedad de Huntington es uno de los nueve trastornos neurodegenerativos heredados originados por una expansión del tracto de poliglutamina. Las proteínas de poliglutamina expandidas se acumulan, de manera anómala, en los agregados intracelulares. Se muestra que la mTOR es secuestrada en los agregados de poliglutamina en modelos celulares, en ratones transgénicos y en cerebros humanos. El secuestro de la mTOR desequilibra su actividad de quinasa e induce la autofagia, una vía de eliminación clave para los fragmentos de huntington mutantes. Esto protege  
35 contra la toxicidad de poliglutamina, ya que el inhibidor de mTOR específico rapamicina atenúa la acumulación de huntington y la muerte celular en los modelos celulares de la enfermedad de Huntington, y la inhibición de autofagia tiene los efectos contrarios.

Además, la mTOR está involucrada en la inflamación, la inmunosupresión y las enfermedades neurodegenerativas.

#### La actividad de MPL sobre la vía inflamatoria NF- $\kappa$ B y sus blancos corriente abajo

40 El factor de transcripción NF- $\kappa$ B ha sido de interés para las respuestas mediadas inflamatorias, esencialmente porque varios mediadores y citoquinas causan la activación de este factor de transcripción. Es más, la activación de la familia de transcripción NF- $\kappa$ B desempeña una función central en la inflamación a través de su capacidad de inducir la transcripción de los genes proinflamatorios. El vínculo entre la activación de NF- $\kappa$ B y la inflamación ha sido mostrado en varias enfermedades humanas y en modelos animales de la enfermedad. Además, la función de NF- $\kappa$ B en la mediación de la inflamación ha sido establecida mediante el uso de enfoques genéticos o con inhibidores químicos.

45 El NF- $\kappa$ B está presente en el citosol como una forma inactiva enlazada a la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ . Cuando es estimulada por señales extracelulares apropiadas, la I $\kappa$ B $\alpha$  es fosforilada por IKK, lo cual da lugar a la degradación mediada por proteasoma de I $\kappa$ B $\alpha$ . Posteriormente, el complejo activo de NF- $\kappa$ B es liberado y se transloca al núcleo para mediar la transcripción de sus genes específicos. El complejo IKK es activado o bien, a través de la autofosforilación, o mediante la fosforilación por una serie de quinasas activadas por mitógeno (MAP3K) en respuesta al  
50 estímulo divergente como por ej., lipopolisacáridos (LPS), IL-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  y TGF- $\beta$ .

Las figuras 27 a 32 muestran la influencia del MPL sobre la vía de transducción de señal NF- $\kappa$ B. Los macrófagos de las células RAW 264.7 estimuladas por LPS se utilizaron como un sistema de modelo *in vitro* para la inflamación.

5 Se observó que el MPL disminuyó la activación de NF- $\kappa$ B en estas células según se evaluó por el análisis de inmunocitoquímica y transferencia Western. Este efecto podría ser confirmado por la inhibición de la fosforilación y translocación nuclear de NF- $\kappa$ B p65 y, además, la inhibición de la fosforilación de IKK y I $\kappa$ B $\alpha$ . El efecto inhibitor del MPL también se observó sobre la expresión de IL-6, TGF- $\beta$  y el óxido nítrico (NO), los cuales son todos mediadores inflamatorios regulados por NF- $\kappa$ B.

Los resultados muestran que el MPL inhibe los mecanismos celulares, los cuales son importantes en la reducción de la inflamación y que el MPL está afectando importantes vías patológicas las cuales no están relacionadas con el cáncer.

10 Los resultados muestran, claramente, que el MPL inhibe los mecanismos celulares, los cuales son importantes en una respuesta a la inflamación y que el MPL está afectando las vías patológicas las cuales no están relacionadas con el cáncer.

### Discusión

15 La mTOR, el blanco mamífero de rapamicina, se denominó así, basado en el precedente de que TOR se descubrió primero a través de los estudios genéticos y moleculares de los mutantes resistentes a la rapamicina de *Saccharomyces cerevisiae* que identificaron a FKBP12, Tor1, y Tor2 como los blancos de rapamicina y proporcionaron un fuerte soporte de que el complejo de FKBP12-rapamicina se une a, e inhibe las funciones celulares de Tor1 y Tor2.

20 La rapamicina detuvo la actividad fúngica en la fase G1 del ciclo celular. En ratas, reprime el sistema inmunitario mediante el bloqueo de la transición de la fase G1 a S en los linfocitos T. En los seres humanos, se utiliza como un inmunosupresor después del trasplante de órganos. La mTOR integra la entrada de las vías corriente arriba, que incluyen insulina, factores de crecimiento (como por ej., IGF-I e IGF-2) y aminoácidos. La mTOR detecta, además, los niveles de nutriente celular, oxígeno y energía. La vía mTOR es desregulada en las enfermedades humanas, como por ej., diabetes, obesidad, depresión y ciertos cánceres. Rapamicina es un producto bacteriano que puede inhibir la mTOR mediante la asociación con su receptor intracelular FKBP12. El complejo FKBP12-rapamicina se une directamente al dominio de unión de FKBP12-rapamicina (FRB) de la mTOR inhibiendo su actividad.

25 Si bien la vía mTOR ha sido identificada como un elemento importante en muchas enfermedades que incluyen el cáncer, a la fecha solo rapamicina está en uso clínico extensivo, y a pesar de su lanzamiento en la década del 90, nuevos productos mTOR han limitado el uso clínico. De manera similar, a pesar de la capacidad de rapamicina para interferir con la vía mTOR, todavía solo es útil para el tratamiento del rechazo de órganos. La presente invención identifica una nueva clase de inhibidores de mTOR que apuntan a diferentes componentes de la vía mTOR para rapamicina, abriendo, de este modo, opciones de tratamiento más amplias para un número de enfermedades importantes.

30 Como se muestra en la tabla 1, el MPL se ensayó, además, sobre las HUVEC. Se halló que el valor de CI50 es 10 veces más alto que el valor de CI50 en OVCAR-3, lo cual refleja la potencia citotóxica más elevada del MPL sobre las células cancerosas que sobre las células no cancerosas.

En los ensayos de formación de colonias, el MPL reprimió la formación de colonias por parte del desarrollo de las células del cáncer de ovario sobre placas de agar de una manera dependiente de la concentración y, por lo tanto, muestra la eficacia del MPL para inhibir el desarrollo de las células cancerosas.

40 Además, se ha mostrado que independientemente del estado de p53 de las células [OVCAR-3 (mutadas), SKOV-3 (nula) y A2780 (natural)], el MPL ejerció sus efectos antineoplásicos (no obstante en diferentes potencias). Esto indica que el MPL sería eficaz en los cánceres de ovario epiteliales independientemente del estado de p53 de su tumor. Este hallazgo puede ser de importancia ya que la mutación p53 es muy común en un amplio intervalo de cánceres.

Se debe entender que los efectos que muestra el MPL pueden ser extendidos a otros tipos de cánceres además del cáncer de ovario.

45 El ciclo celular mamífero está regido por la activación secuencial de las Cdk. La progresión a través de la fase G1 y la entrada a la fase S es regulada por la Cdk2 complejada con ciclina A y ciclina E. Por lo tanto, la represión de la expresión de estas proteínas reguladoras altera el progreso del ciclo celular.

50 La inhibición de la proliferación celular y la formación de colonias son dependientes de la concentración en el MPL. Un mecanismo posible por el cual el MPL altera la progresión del ciclo celular es la regulación descendente de las proteínas reguladoras del ciclo celular E y A y las quinasas dependientes de ciclina Cdk4 y Cdk2 que originan la detención de G1.

Como resultado de la detención de G1, las células no progresan a la próxima etapa del ciclo como se muestra por una reducción drástica de células en las fases S y G2-M en el transcurso del tiempo. El porcentaje de células en la fase G2-M del grupo tratado con el vehículo fue más de tres veces superior a las del grupo tratado con 25  $\mu$ M de MPL.

5 Es más, la evidencia de autofagia en las líneas celulares del cáncer tratadas con MPL, indica que las células salen irreversiblemente del ciclo celular a través de una detención del ciclo celular de fase G0.

**Discusión adicional**

10 La evidencia acumulativa soporta la hipótesis de que la mTOR actúa como un «interrupor maestro» del catabolismo y anabolismo celular, señalizando las células para expandir, desarrollar y proliferar. Si bien se halló, virtualmente, en todas las células mamíferas, es particularmente importante en las células tumorales que proliferan e invaden de manera agresiva.

Los tratamientos que apuntan contra las vías de señalización celular han mostrado alguna promesa en el manejo de tumores sólidos y tumores malignos hemáticos. La mTOR mostró ser una quinasa clave que actúa corriente abajo de la activación de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K).

15 Los agentes que inhiben específicamente la mTOR están siendo desarrollados, actualmente, como medicamentos antineoplásicos potenciales.

Los agentes inhibidores de la mTOR interrumpen, esencialmente, la progresión del ciclo celular a través de la inducción de la detención de la fase G1. Rapamicina es el prototipo del inhibidor de mTOR.

20 La biología de mTOR ha proporcionado conocimiento en el desempeño de la mTOR en varios cánceres. Una mTOR activa coordina una respuesta en el desarrollo celular directamente a través de sus efectos sobre los reguladores del ciclo celular e indirectamente sosteniendo el suministro de nutrientes dentro de la célula a través de la producción de transportadores de nutrientes y, además, a través de la promoción de angiogénesis. Una forma primaria en que la mTOR ejerce sus efectos reguladores sobre la proliferación celular es mediante el control de la producción de ciclina D1. La mTOR proporciona el soporte de nutrientes adecuado para sostener el desarrollo celular y la proliferación anómala. Dado que la vía mTOR es desregulada en un número de cánceres, se espera que los inhibidores de mTOR ejerzan amplios efectos terapéuticos antineoplásicos.

25 Los marcadores moleculares sustitutos pueden ser utilizados para monitorear los efectos biológicos de los inhibidores de mTOR como por ej., los derivados de rapamicina y reducir las dosis biológicamente activas en los pacientes. Estos pueden incluir la expresión de ciclina D1, ciclina E, la fosforilación de P70S6K o la expresión de caspase 3 y c-Myc. La ciclina D1 es un proto-oncogén, cuya amplificación génica y sobreexpresión de la proteína se observa, con frecuencia, en las células tumorales. La ciclina D1 induce la progresión del ciclo celular de G1 a S.

30 Se ha mostrado que el MPL detiene la progresión del ciclo celular en la fase G1. En la presente memoria se presentan los datos de ratones que portan el tumor tratado con MPL que muestra la regulación descendente drástica de la ciclina D1. Es más, la expresión tumoral de la ciclina E, otro intermediario importante de la vía de señalización de mTOR y de la progresión del ciclo celular, también es reprimida en los tumores tratados con MPL. Las ciclinas D y E, conocidas como ciclinas G1, se unen a CDK4 y CDK2, respectivamente y facilitan la transición de la fase G1 a S. La pérdida de ciclina D1 en las células de cáncer de ovario es suficiente para inducir la detención del ciclo celular G1 y esta estrategia no está obstaculizada por la presencia de la ciclina E2. Se ha indicado, incluso, que la ciclina D1 es un blanco terapéutico suficiente en las células de cáncer de ovario. Está bien establecido que la c-Myc afecta el ciclo celular en múltiples puntos que incluyen las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6, las cuales se unen a la ciclina D1, y reduce la magnitud de la activación de la ciclina E-Cdk2.

35 La expresión desregulada del proto-oncogén c-MYC se produce en un amplio intervalo de cánceres humanos y, con frecuencia, está asociada con un pobre diagnóstico, lo que indica un desempeño clave para este oncogén en la progresión tumoral a través del factor de transcripción que regula la proliferación celular, el desarrollo y la apoptosis. La expresión desregulada o la función de c-Myc es una de las anomalías más comunes en los tumores malignos humanos. En la presente memoria se revela que el MPL actúa sobre ambos mediadores del tránsito del ciclo celular (G1 a S), es decir ciclina D1 y c-Myc.

40 La mTOR quinasa controla la maquinaria de la traducción, en respuesta a los aminoácidos y a los factores de crecimiento, a través de la activación de la p70 ribosomal S6 quinasa (p70S6K) y la inhibición de la proteína de unión eIF-4E (4E-BP1).

50 Como un efector corriente abajo importante de la mTOR, la S6K está involucrada en varios procesos celulares, que incluyen la transcripción y la traducción de proteínas, las cuales median el crecimiento celular y el metabolismo. Sobre esta base, la mTOR-S6K presenta un eje crítico para la traducción de las señales específica (factores de crecimiento,

nutrientes y hormonas) dentro de la respuesta celular. La fosforilación de p70 por mTOR también es crítica para la biogénesis del ribosoma.

5 Los resultados que se muestran en las figuras 9 a 11 demuestran que la inhibición inducida por MPL de la activación de la mTOR que provoca la regulación descendente de p-mTOR, c-Myc [oncogén], ciclina D1, ciclina E2, las quinasas 2 y 4 dependientes de ciclina [esenciales para la progresión del ciclo celular] y la P70S6K.

En resumen, el MPL produce la autofagia a través de la vía mTOR e inhibe, especialmente, la p-P70S6K (Thr 389), la cual es una parte corriente abajo de la vía de señalización de mTOR conocida para regular la angiogénesis y la autofagia.

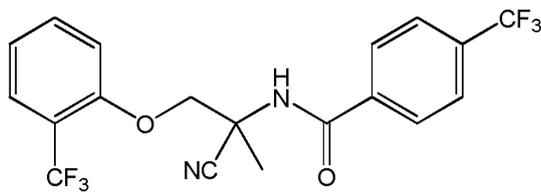
10 La presente divulgación muestra, además, que el MPL inhibe la ciclina D1, la cual es necesaria para la progresión del ciclo celular y está sobreexpresada en muchos cánceres serios. La regulación descendente de P70S6K ha sido demostrada por otros para inhibir la fosforilación y, de este modo, la actividad de la ciclina D1, la cual se ajusta a los hallazgos de la presente invención. La P70S6K regula, además, la PDCD4, la quinasa de adhesión focal, E cadherin, B catenina y transglutominato 2 del tejido, las cuales son importantes en la metástasis y en la invasión.

15 El efecto del MPL/autofagia, de acuerdo con la presente divulgación, muestra que el MPL y los AAD similares son útiles en el tratamiento de las enfermedades donde la autofagia es deficiente, como por ej., accidente cerebrovascular, las enfermedades neurodegenerativas, las deficiencias de la  $\alpha$ 1 antitripsina, los trastornos del almacenamiento liposomal, la cardiomiopatía, los trastornos inmunitarios y las enfermedades autoinmunitarias, la infección bacteriana y viral, los parásitos, los trastornos lipídicos e incluso el envejecimiento. Otros ejemplos incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, las enfermedades relacionadas con la edad, las enfermedades relacionadas con el rechazo  
20 al trasplante, las enfermedades inflamatorias crónicas, las enfermedades relacionadas con el almacenamiento de glucógeno, la metástasis, el lupus sistémico, las enfermedades relacionadas con la inflamación y la activación inmunitaria, la anemia, leucopenia, trombocitopenia, las enfermedades relacionadas con los recubrimientos de stents, la insuficiencia renal, obesidad, diabetes/resistencia a la insulina, las enfermedades relacionadas con el hígado graso no alcohólico, el riñón poliquístico, la enfermedad de Parkinson y la fibrosis.

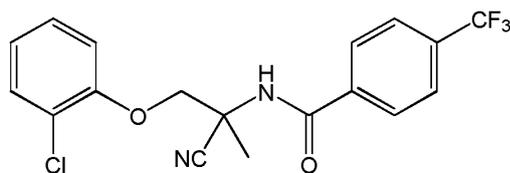
25 La presente divulgación muestra claramente que el MPL produce autofagia (a través de la vía mTOR) y, de este modo, puede ser un tratamiento útil aparte de su uso para el cáncer.

REIVINDICACIONES

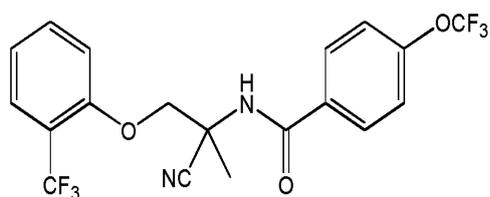
1. Un compuesto que se selecciona de uno cualquiera de los siguientes compuestos:



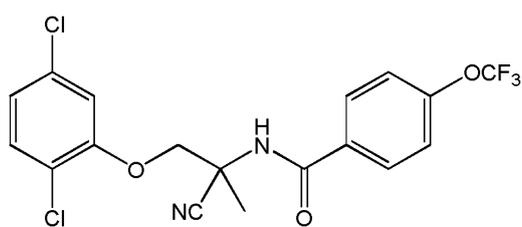
AAD 907;



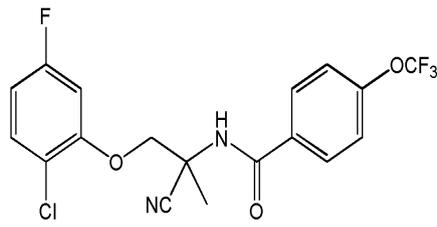
AAD 450;



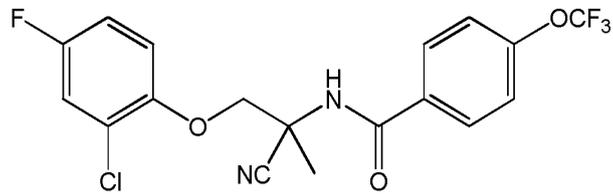
AAD 970;



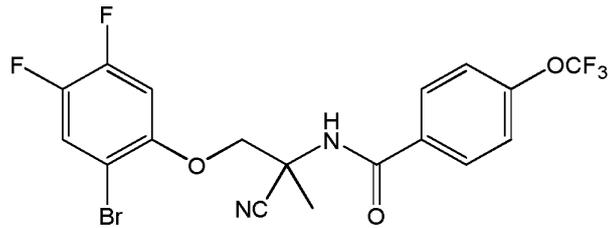
AAD 1154;



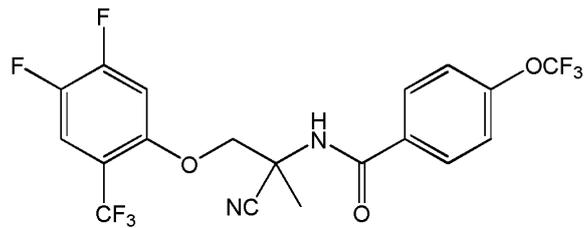
AAD 004;



AAD 2009;



AAD 1336; 1 °



AAD 1470

- o su sal o solvato aceptable desde el punto de vista farmacéutico para su uso en el tratamiento de una o más enfermedades relacionadas con la vía mTOR, en donde la única o más enfermedades relacionadas con la vía mTOR se selecciona de las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades relacionadas con la edad, las enfermedades relacionadas con el rechazo de trasplante, las enfermedades inflamatorias crónicas, las enfermedades relacionadas con el almacenamiento de glucógeno, el lupus sistémico, las enfermedades relacionadas con la inflamación y la activación inmunitaria, la anemia, la leucopenia, la trombocitopenia, las enfermedades relacionadas con los recubrimientos de stents, la insuficiencia renal, obesidad, diabetes/resistencia a la insulina, las enfermedades relacionadas con el hígado graso no alcohólico, el riñón poliquístico y la fibrosis..
- 5
- 10
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en un procedimiento de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el compuesto es el enantiómero (R) o (S) o el racemato.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en un procedimiento de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la enfermedad relacionada con la vía mTOR es la enfermedad inflamatoria crónica.
- 15
4. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, para uso en un procedimiento de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el cual la enfermedad inflamatoria crónica es artritis reumatoide o rechazo al órgano después del trasplante.
- 20
5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, para uso en un procedimiento de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la fibrosis es fibrosis del hígado, fibrosis cardiaca o fibrosis pulmonar.
6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, para uso en un procedimiento de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la enfermedad relacionada con la vía mTOR es la enfermedad neurodegenerativa.
- 25
7. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, para uso en un procedimiento de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la enfermedad relacionada con la vía mTOR es la enfermedad neurodegenerativa.
8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, para uso en un procedimiento de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington o la enfermedad de Parkinson.
- 30
9. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, para uso en un procedimiento de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el cual la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson.
- 35
10. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, para uso en un procedimiento de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el cual la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Huntington.
11. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, para uso en un procedimiento de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el cual la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

Figura 1

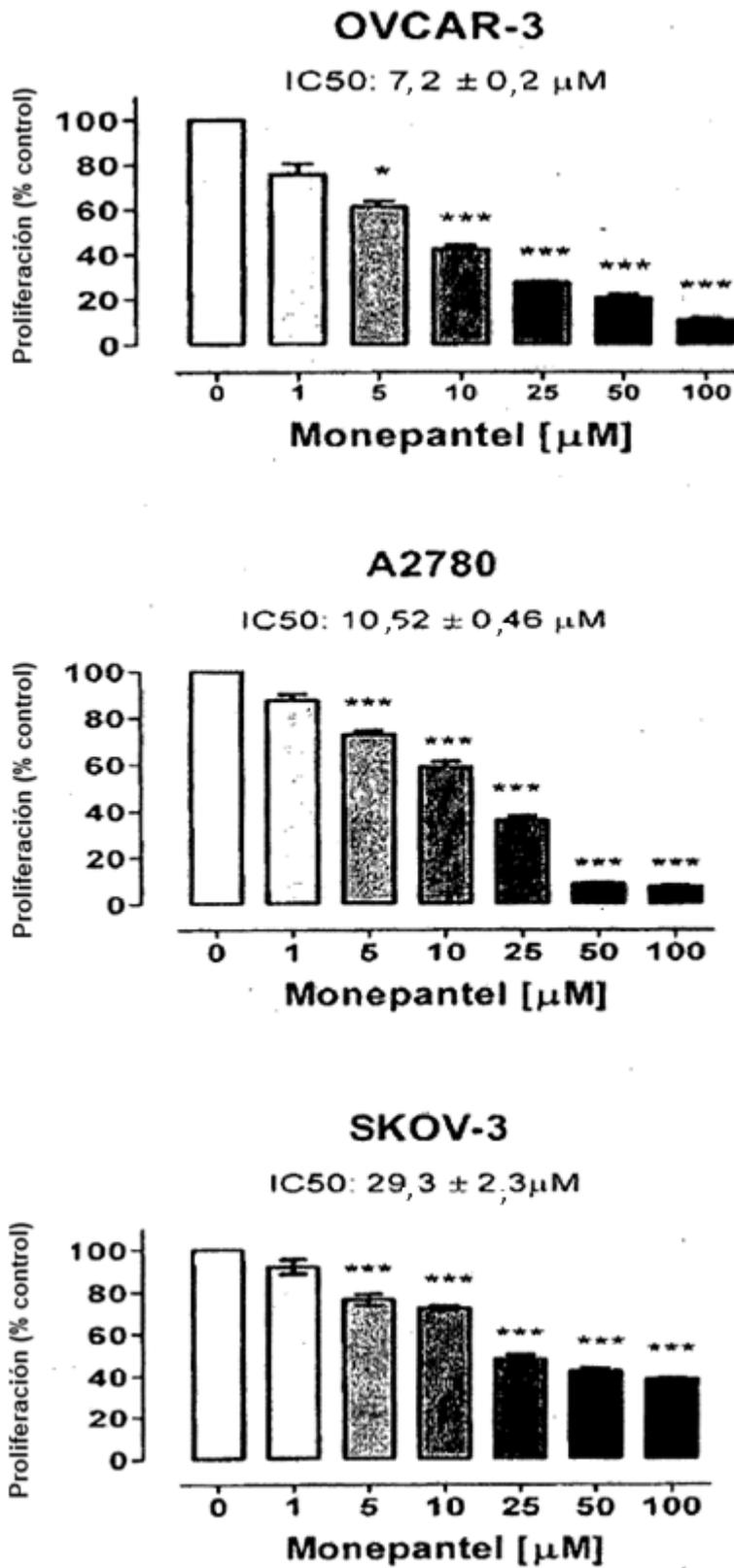


Figura 2

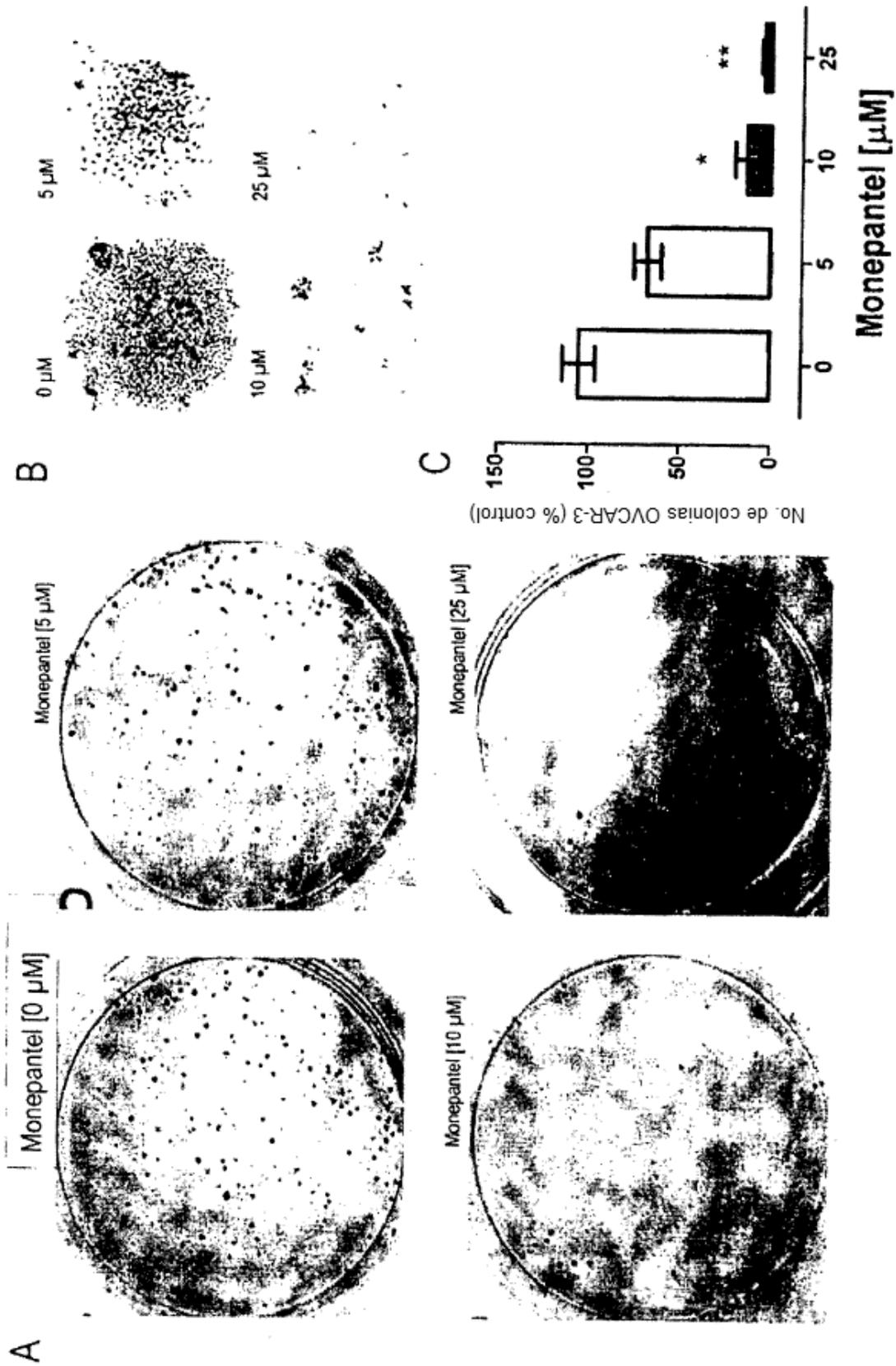
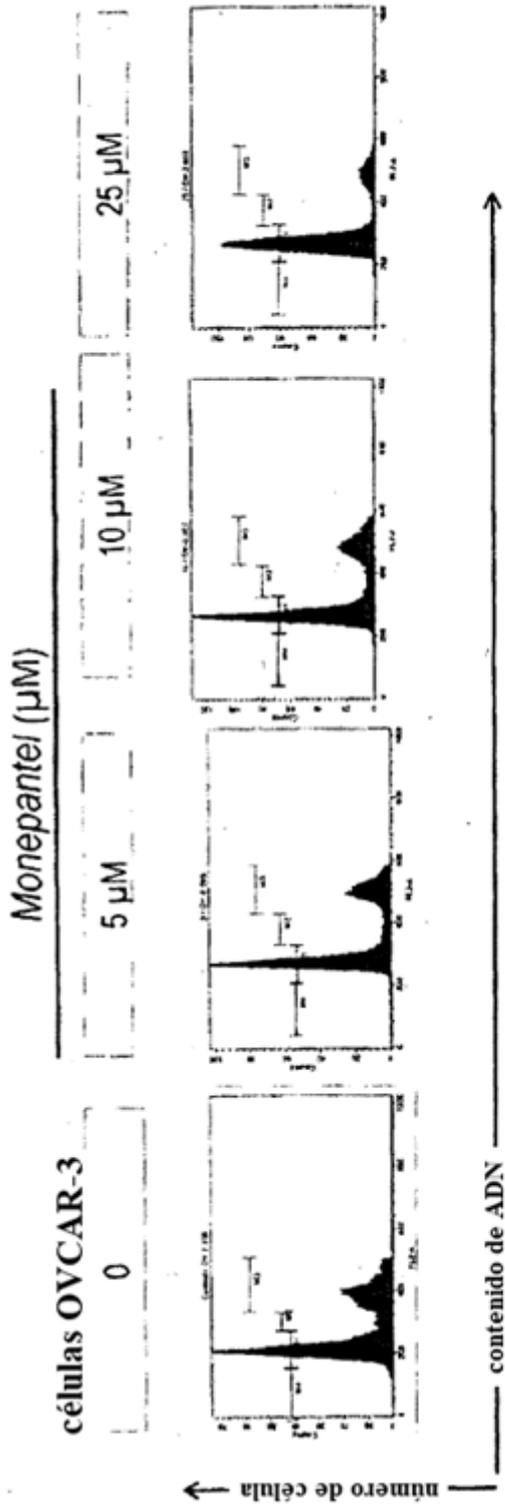
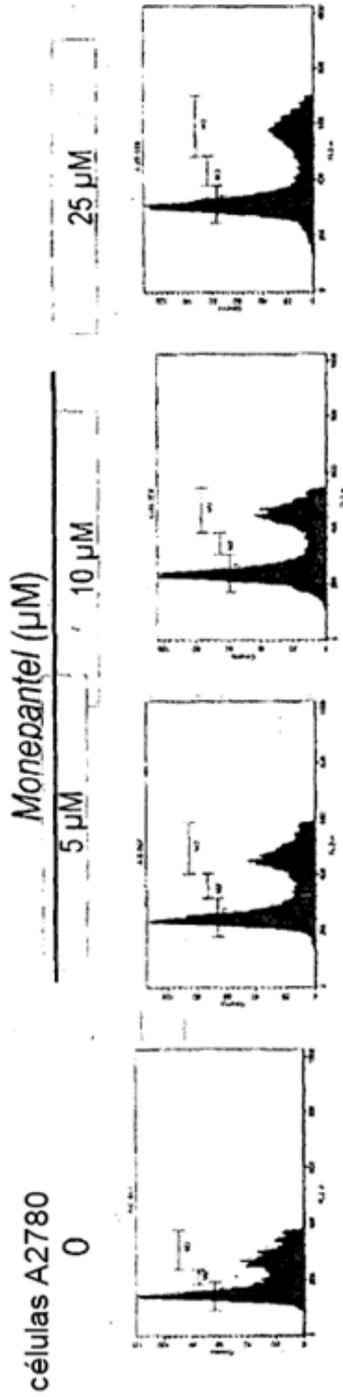


Figura 3a



	0	5	10	25
Sub-G1	0.51%±0.08%	0.32%±0.08%	0.23%±0%	0.48%±0.07%
G1	65.85%±6.50%	70.75%±6.85%	73.87%±5.44%	87.76%±2.22%
S	8.36%±1.89%	8.67%±2.13%	6.98%±0.81%	2.54%±0.55%
G2-M	23.51%±7.9%	20.3%±8.6%	18.94%±6.24%	6.2%±2.9%

Figura 3b



	0	5	10	25
<b>Sub-G1</b>	1.43% ± 0.23%	1.045% ± 0.02%	2.13% ± 0.16%	3.07% ± 0.05%
<b>G1</b>	52.02% ± 1.82%	55% ± 0.01%	58.83% ± 1.23%	63.14% ± 2.7%
<b>S</b>	10.43% ± 3.4%	9.65% ± 0.25%	9.46% ± 1.5%	7.02% ± 1.3%
<b>G2-M</b>	37.89% ± 3.45%	33.98% ± 0.18%	28.85% ± 1.6%	25.41% ± 0.3%

Figura 4

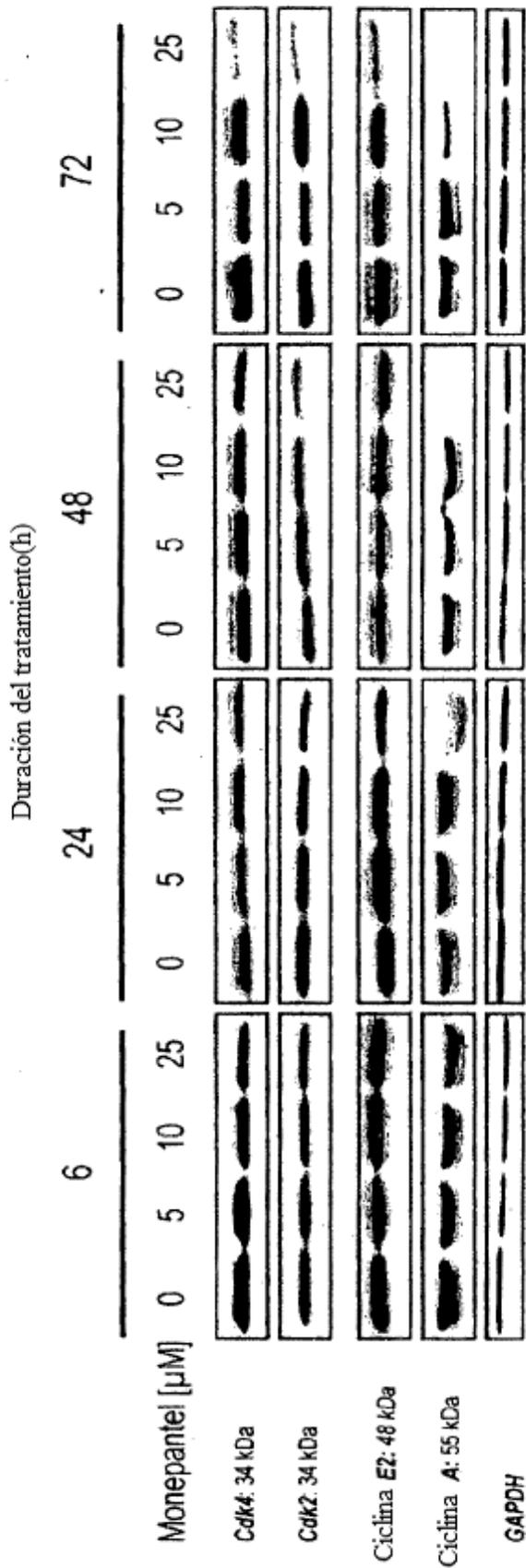


Figura 5

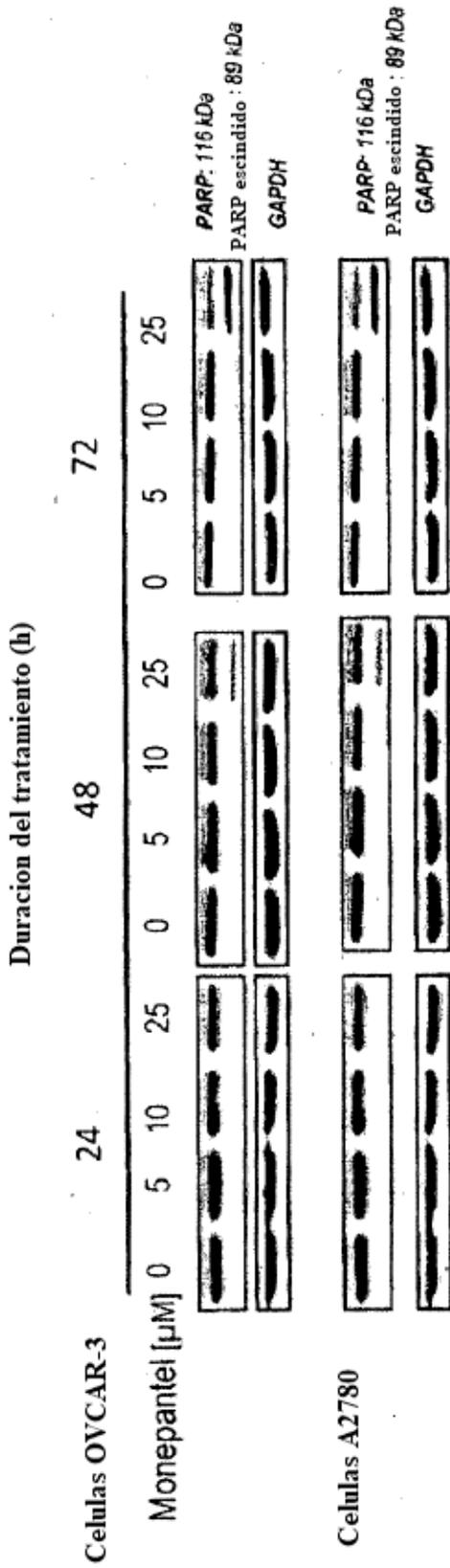


Figura 6

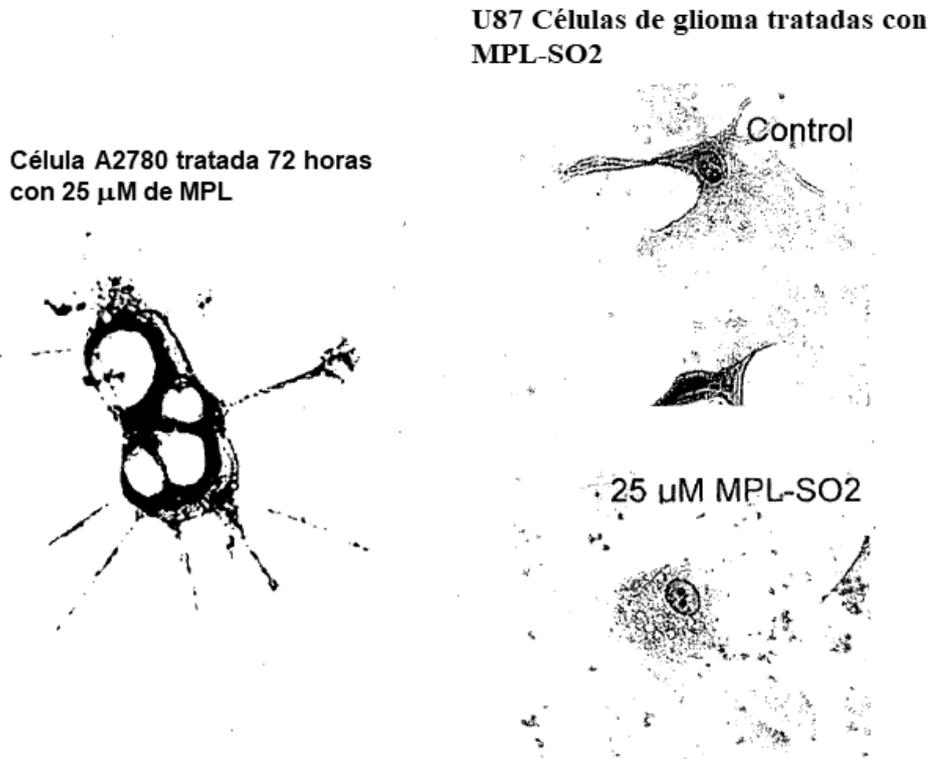


Figura 7

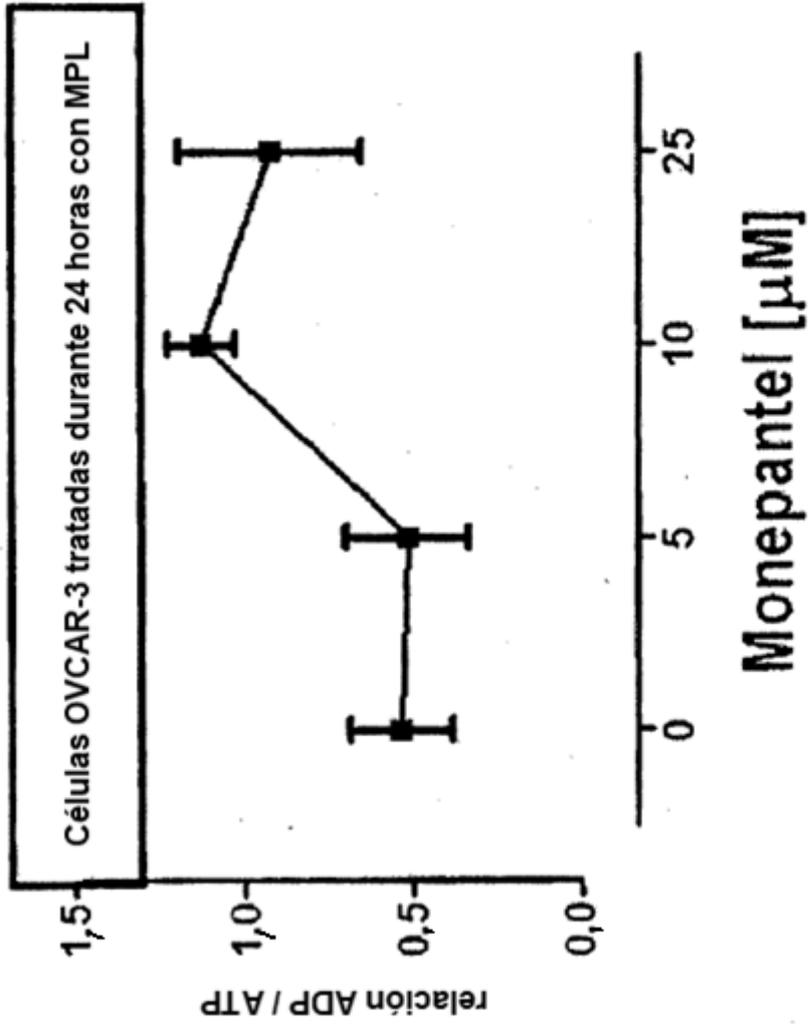


Figura 8

Monepantel disminuye el nivel de ATP en las células OVCAR-3 y A2780 después de 24 horas

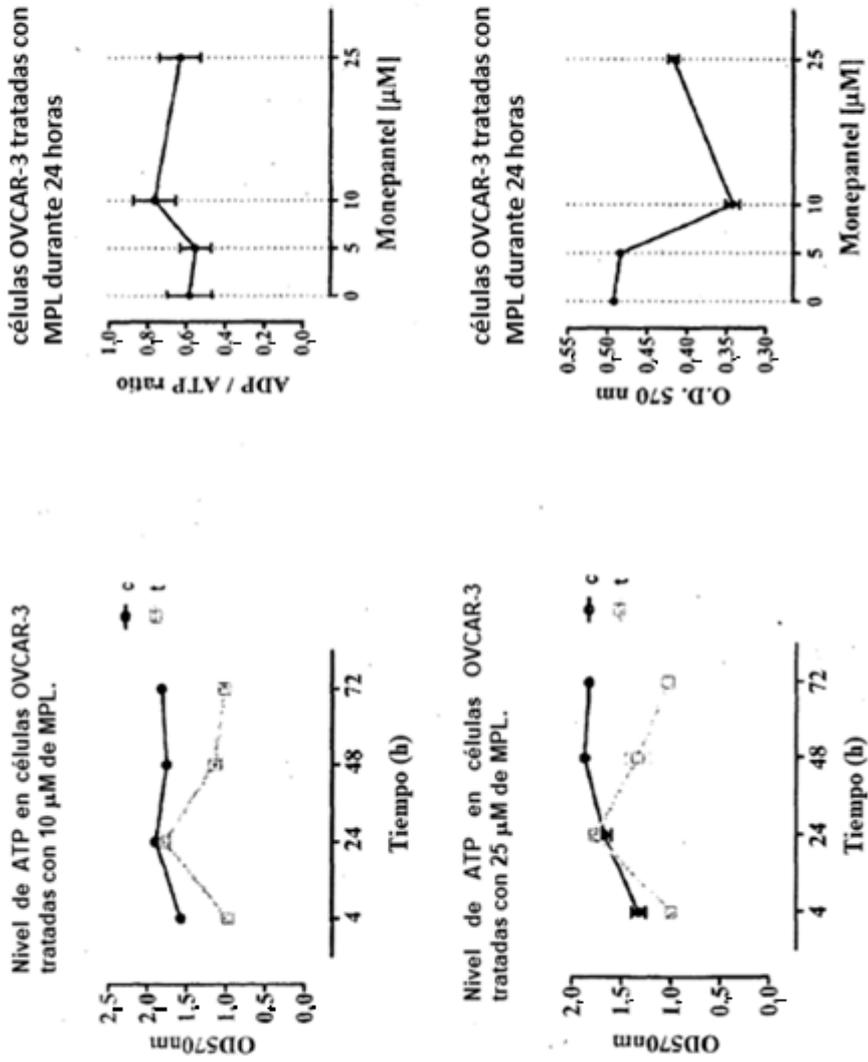


Figura 9

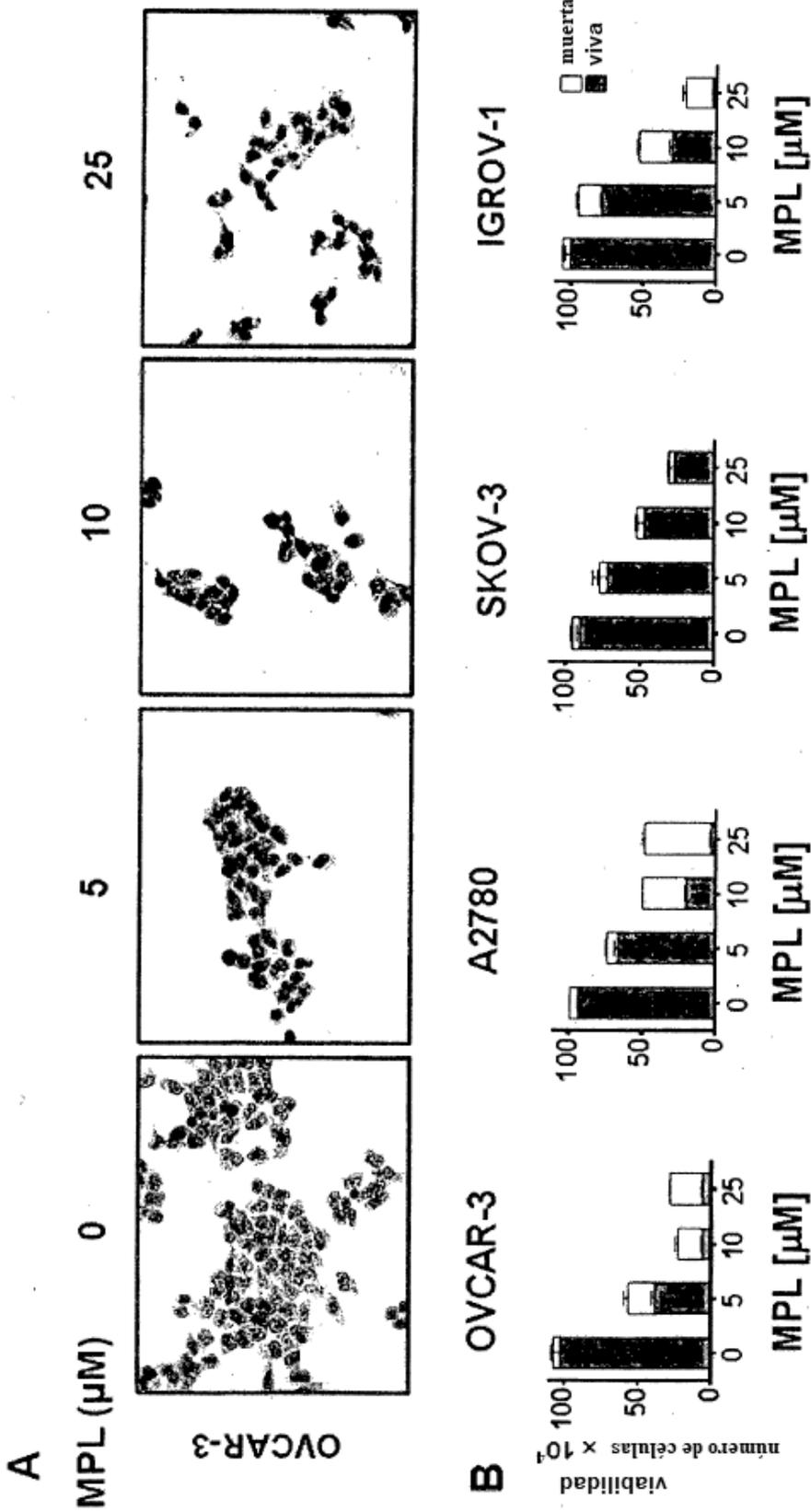


Figura 10

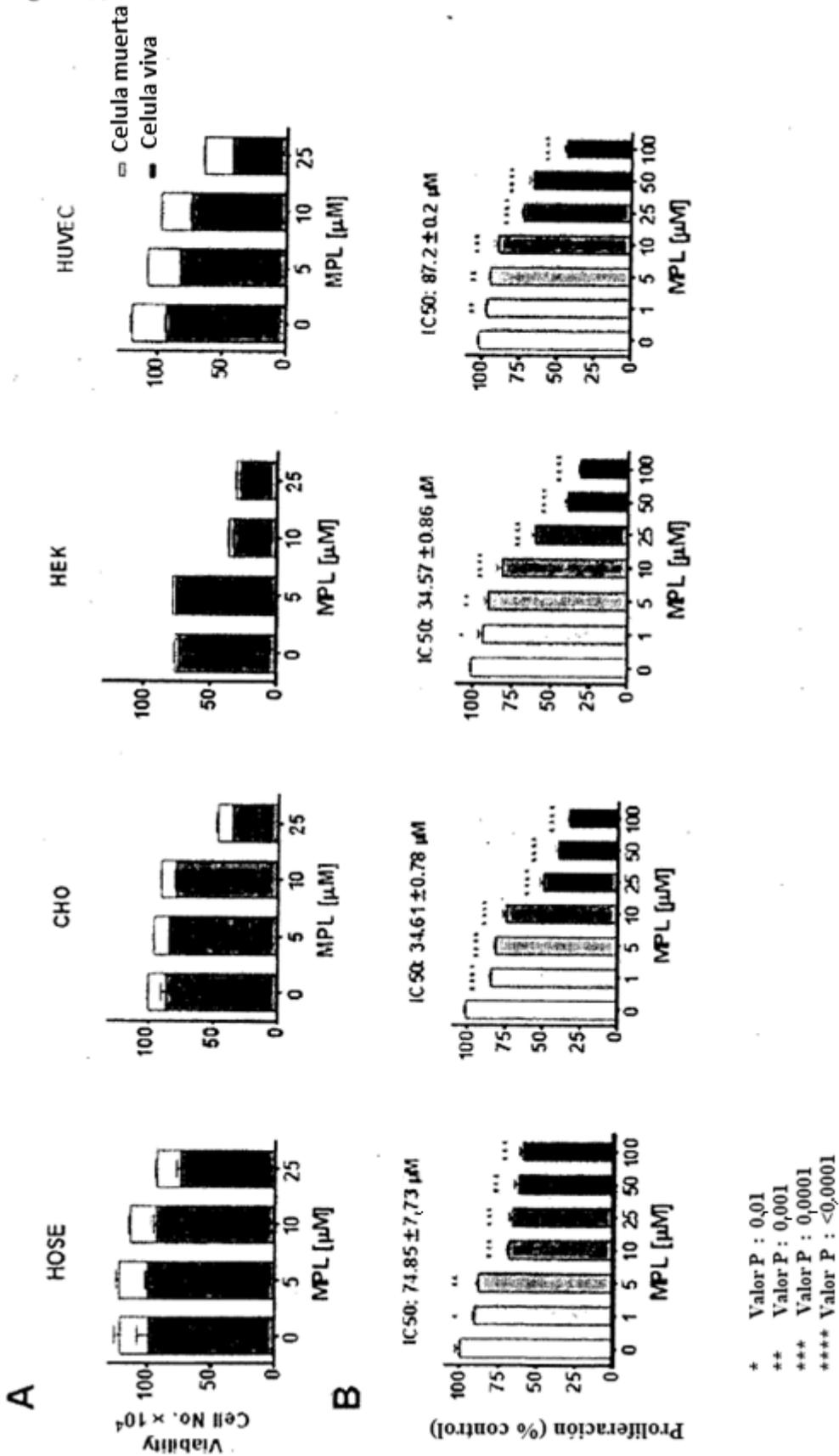
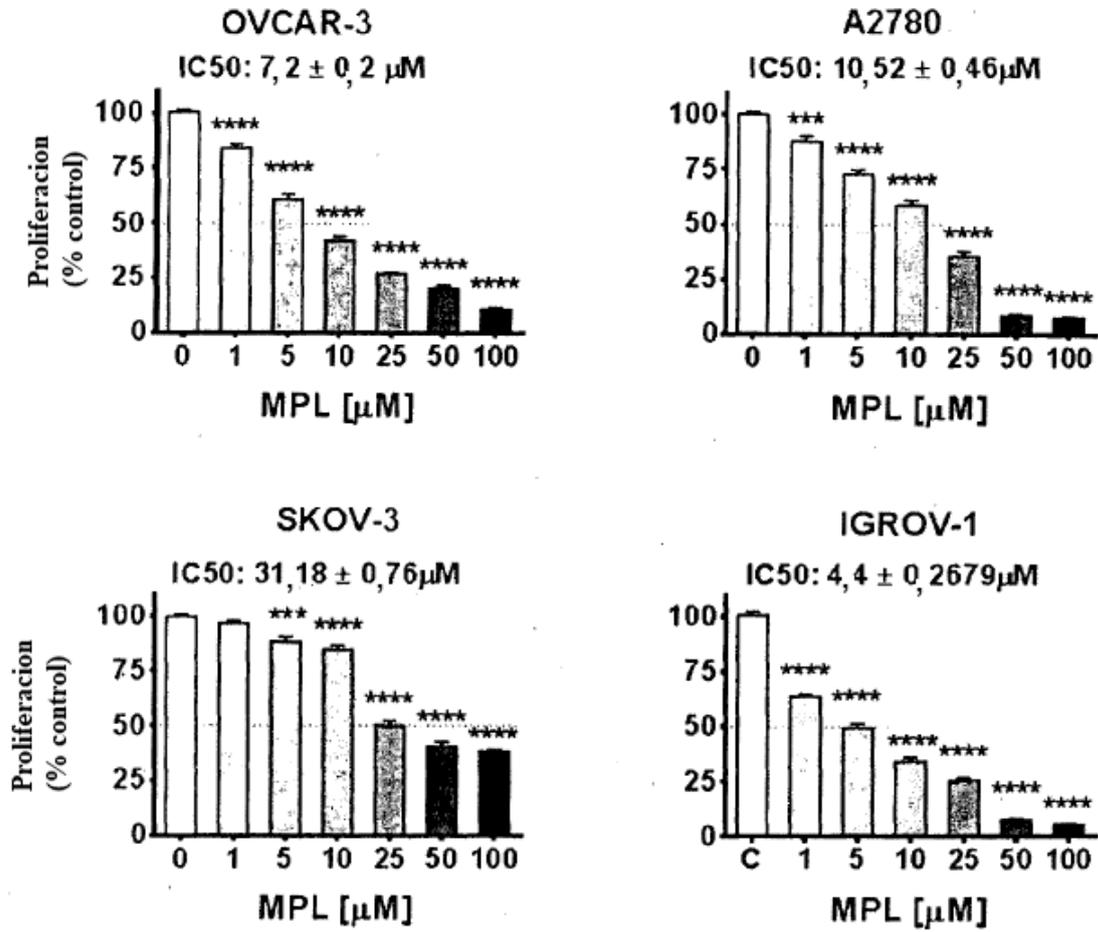


Figura 11



\*\*\*\* Valor P:  $< 0,0001$   
 \*\*\* Valor P:  $0,0003$   
 Valor P no star  $0,0699$

Figura 12

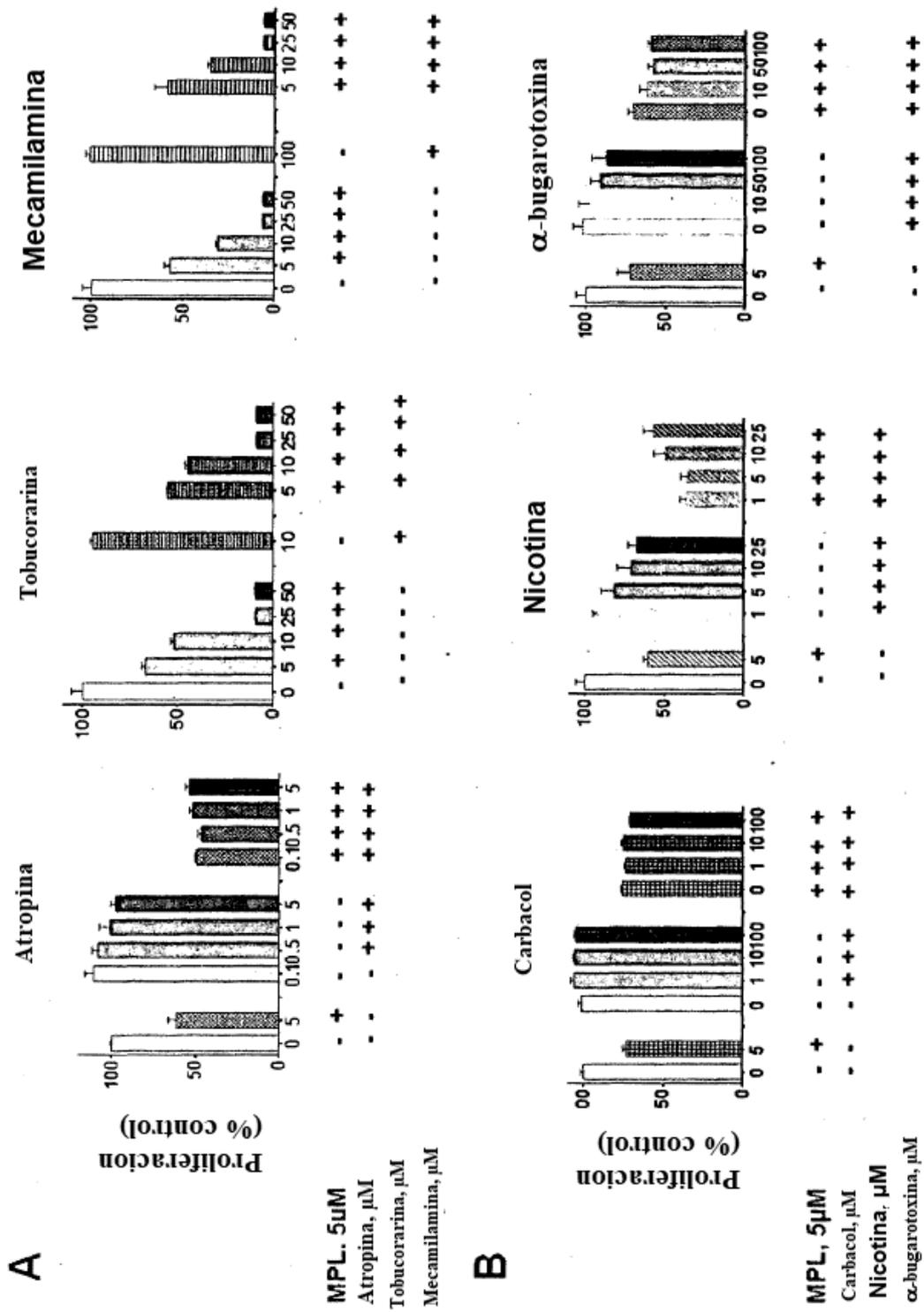
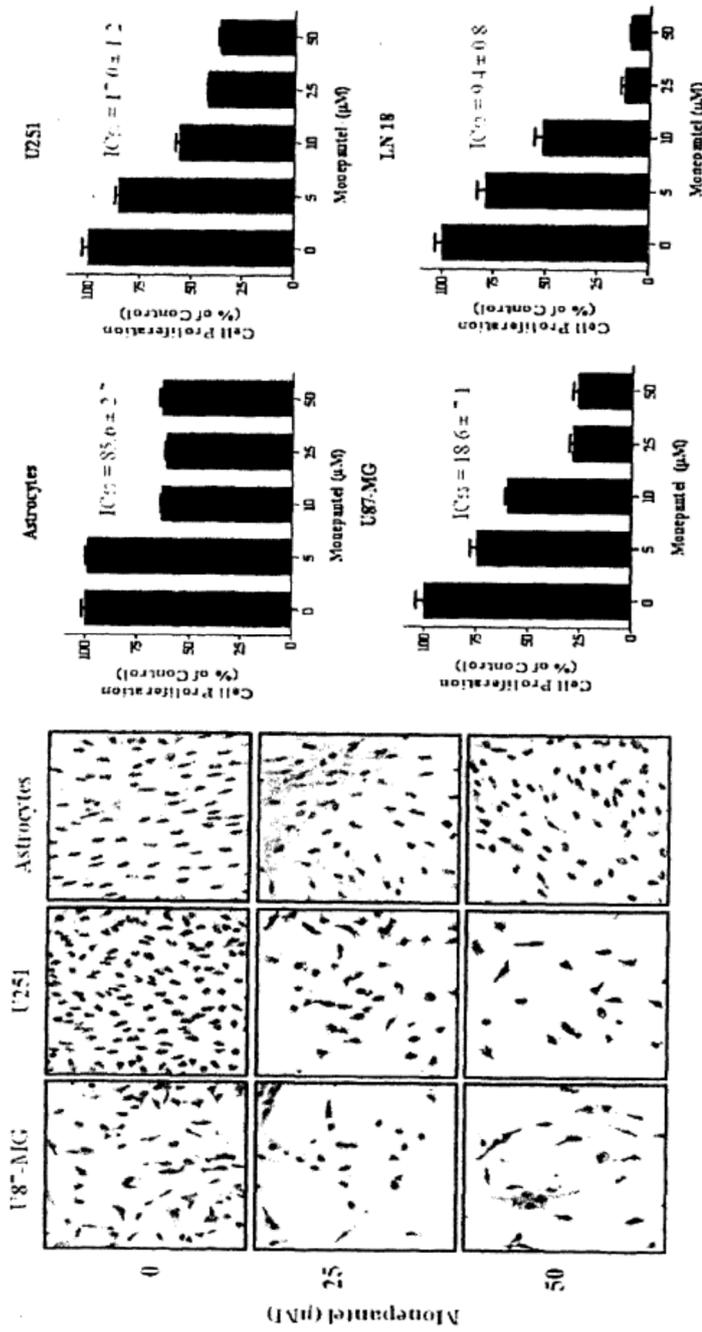


Figure 13



Cell proliferation = proliferaci3n celular

Astrocytes = astrocitos

Figura 14

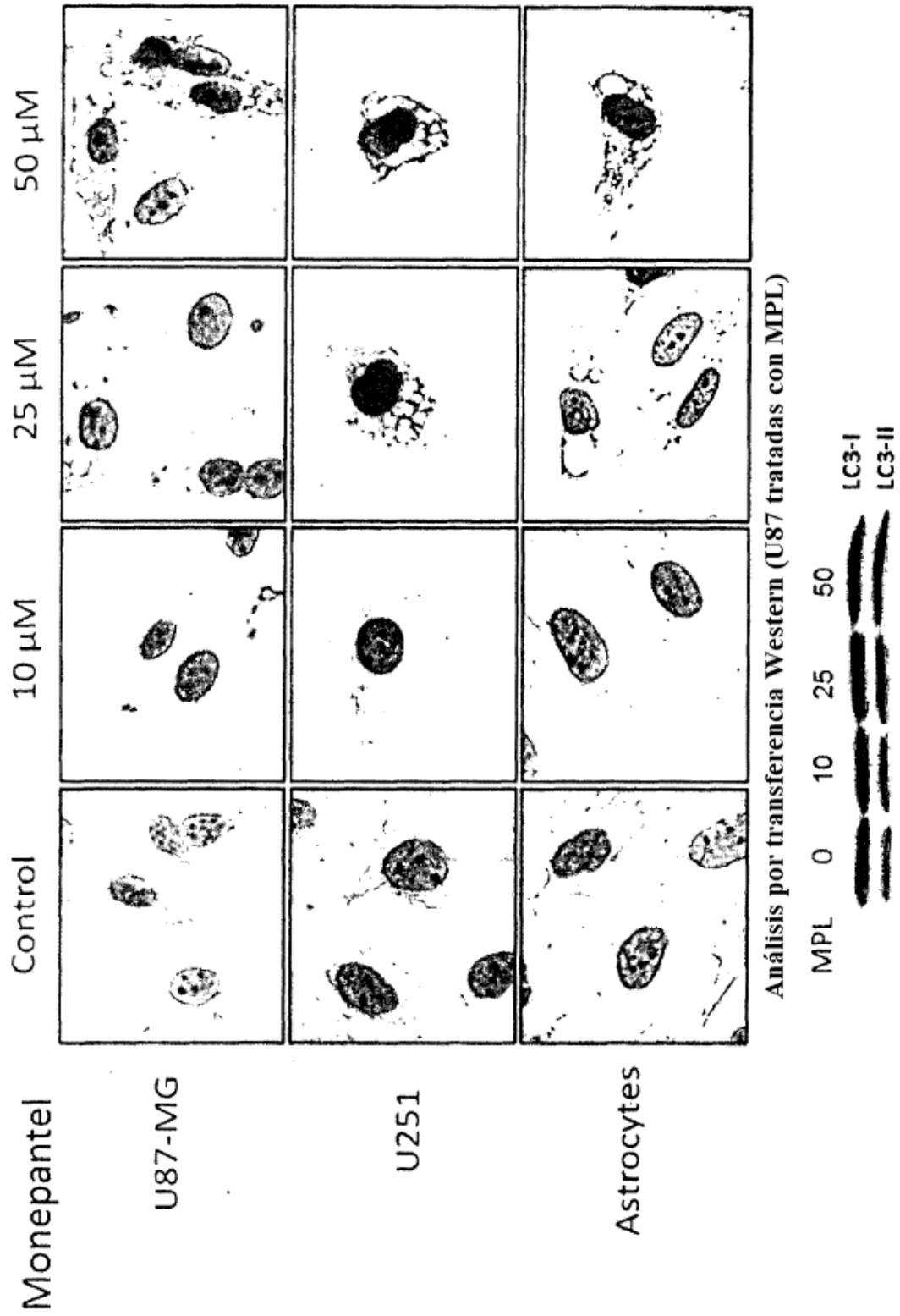


Figura 15

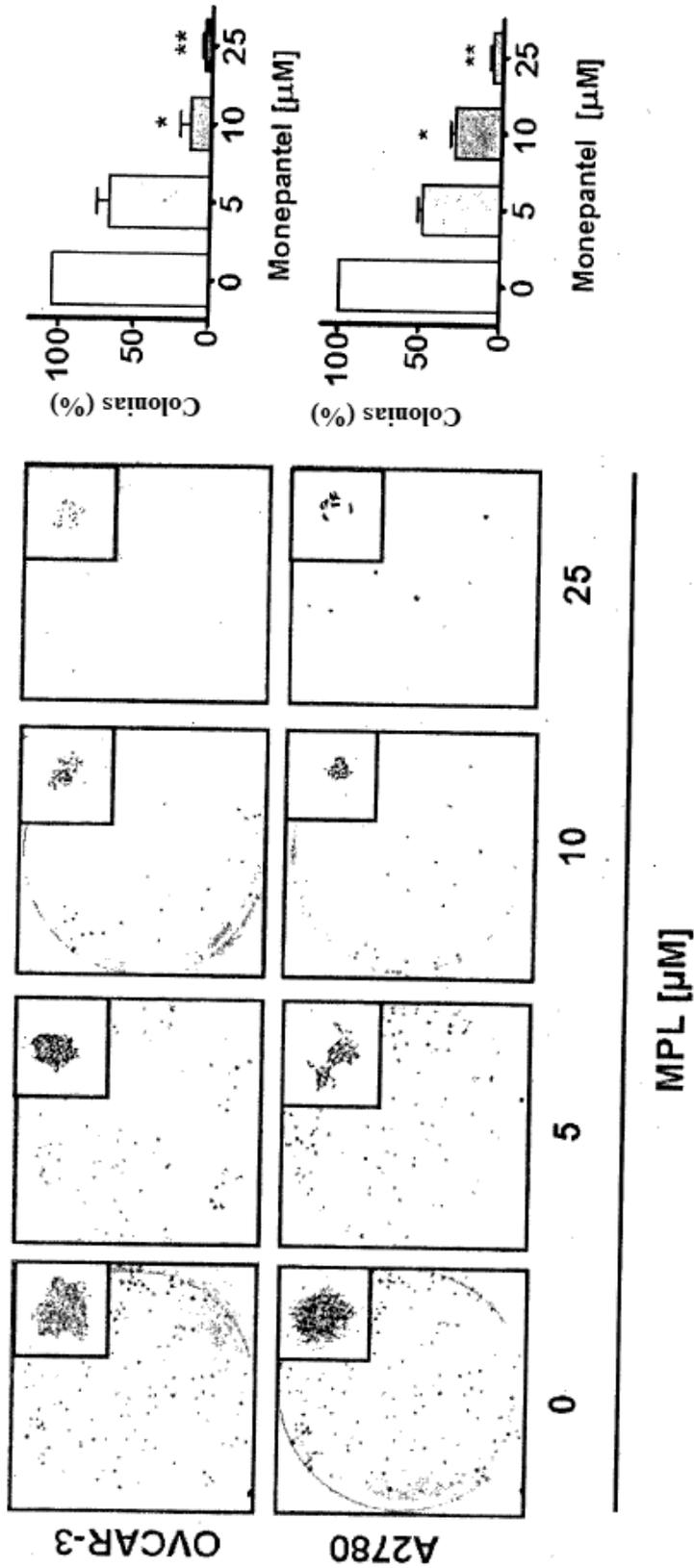


Figura 16

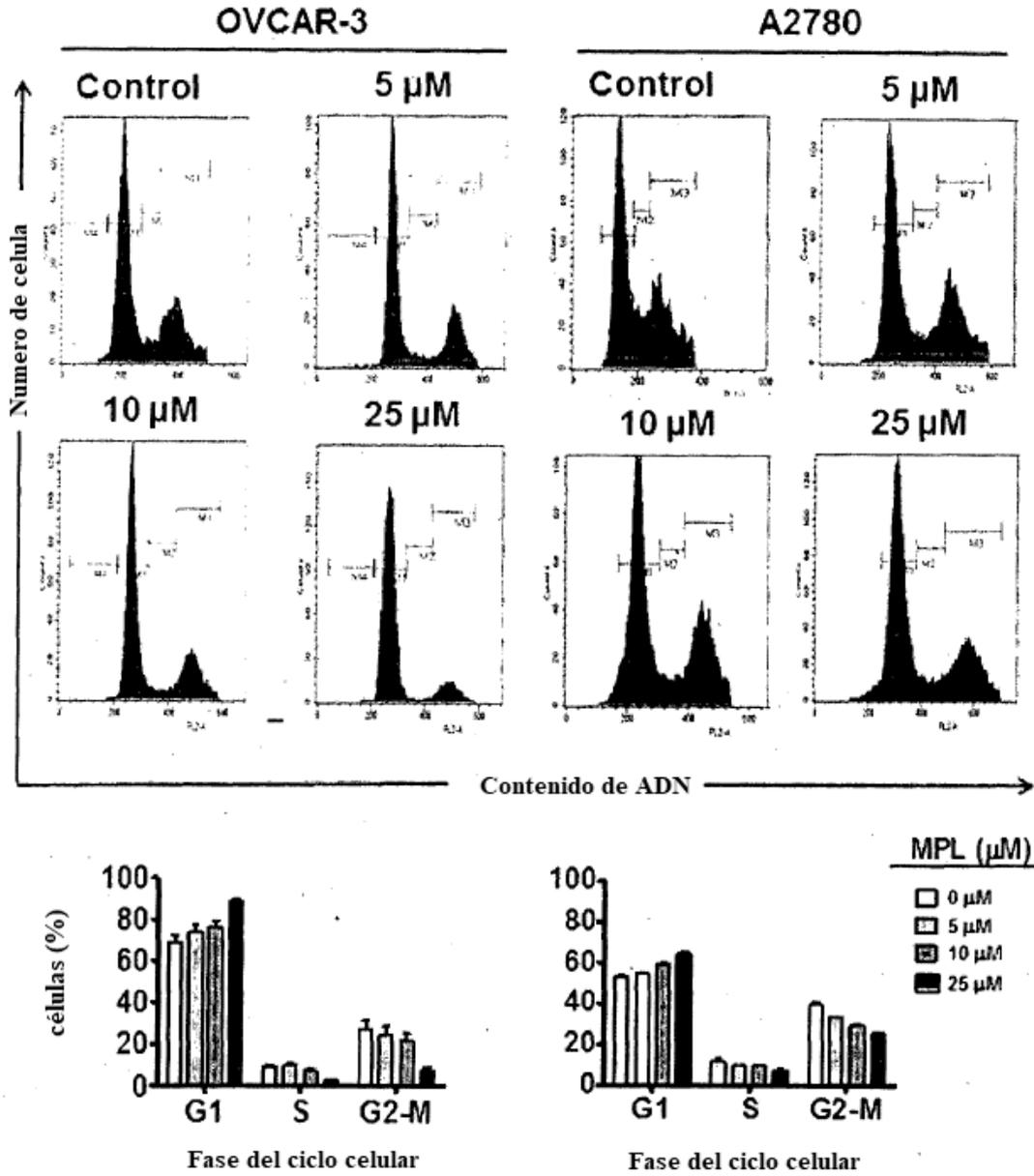


Figura 17

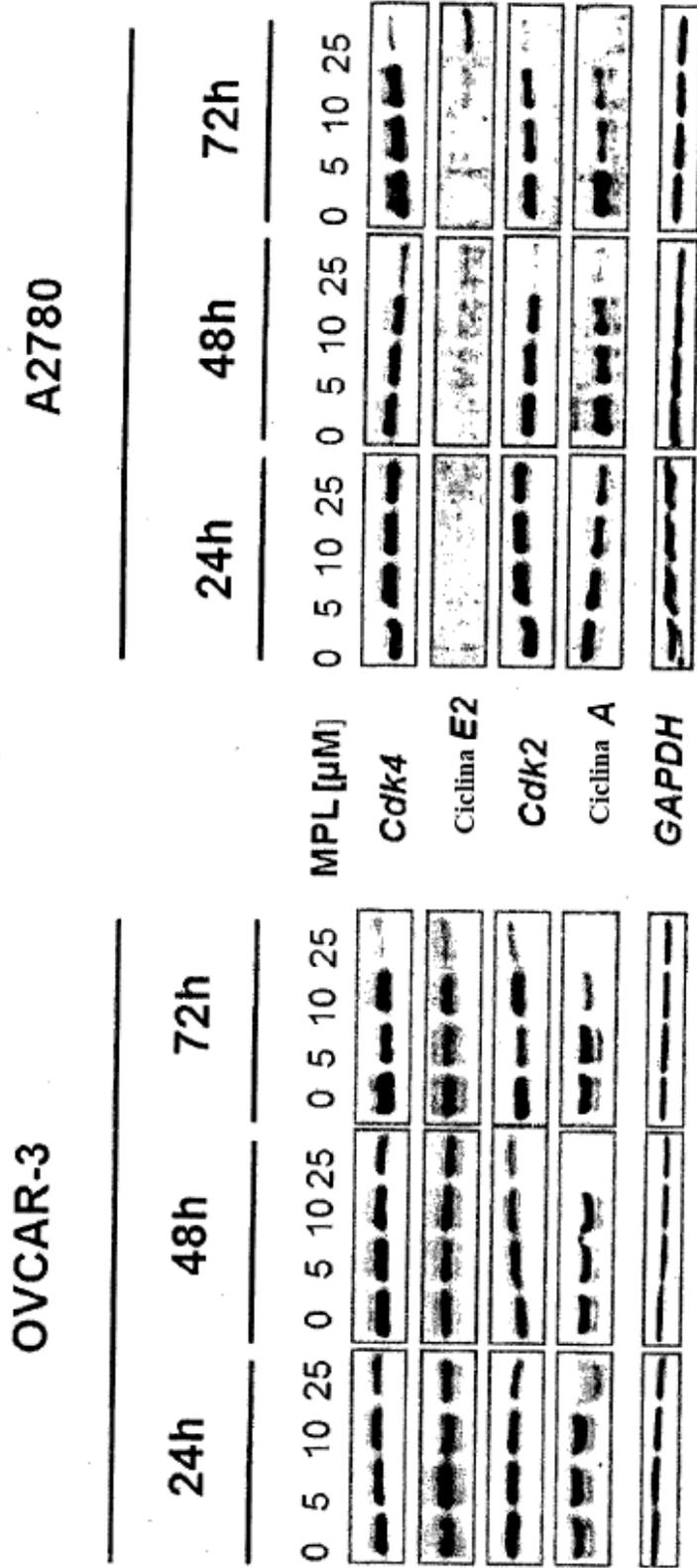


Figura 18

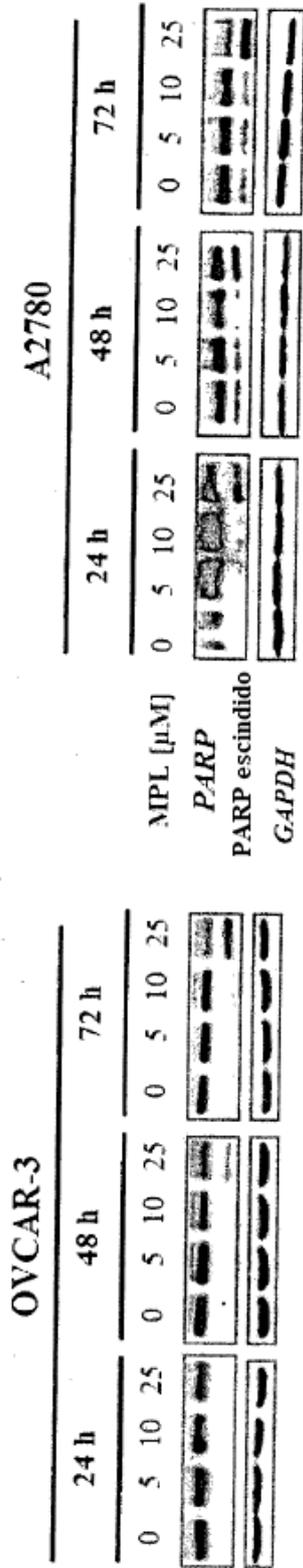


Figura 19A

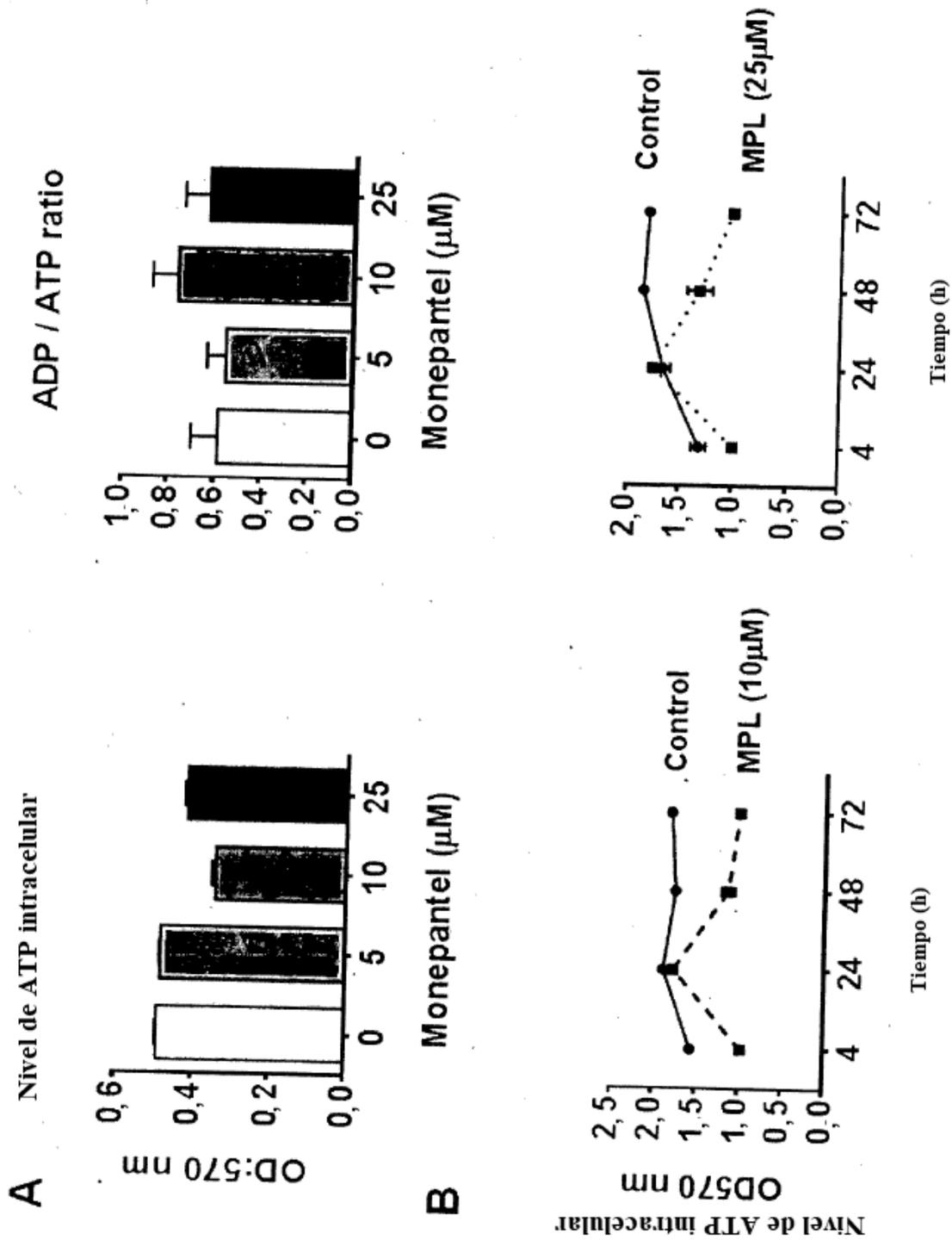


Figura 19B

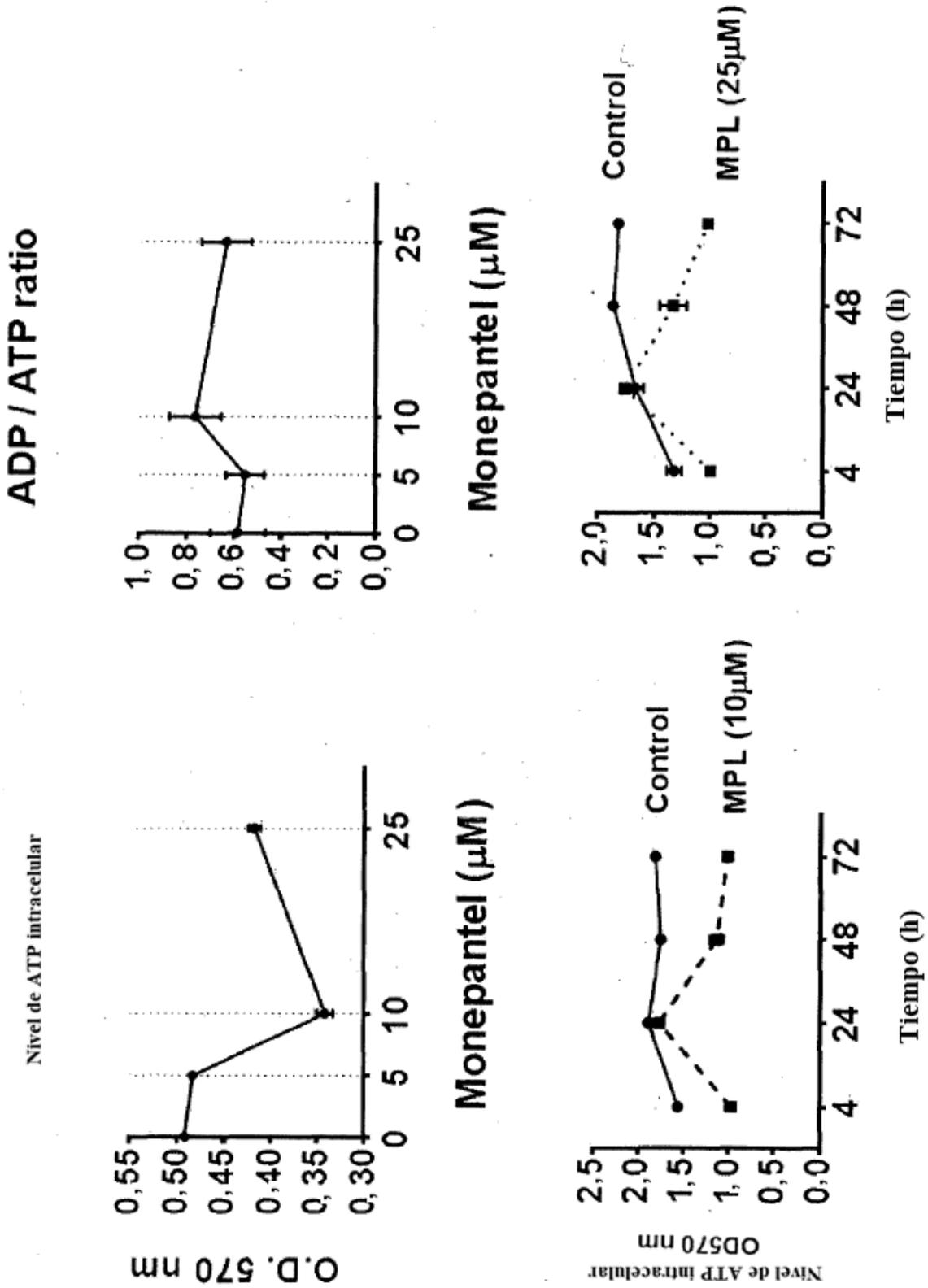


Figura 20

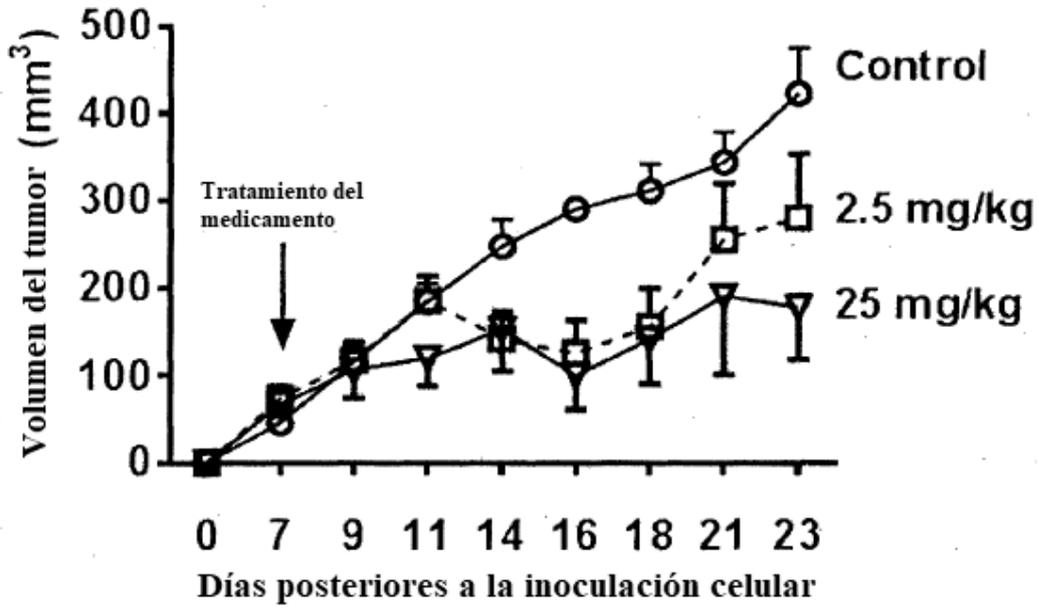


Figura 21

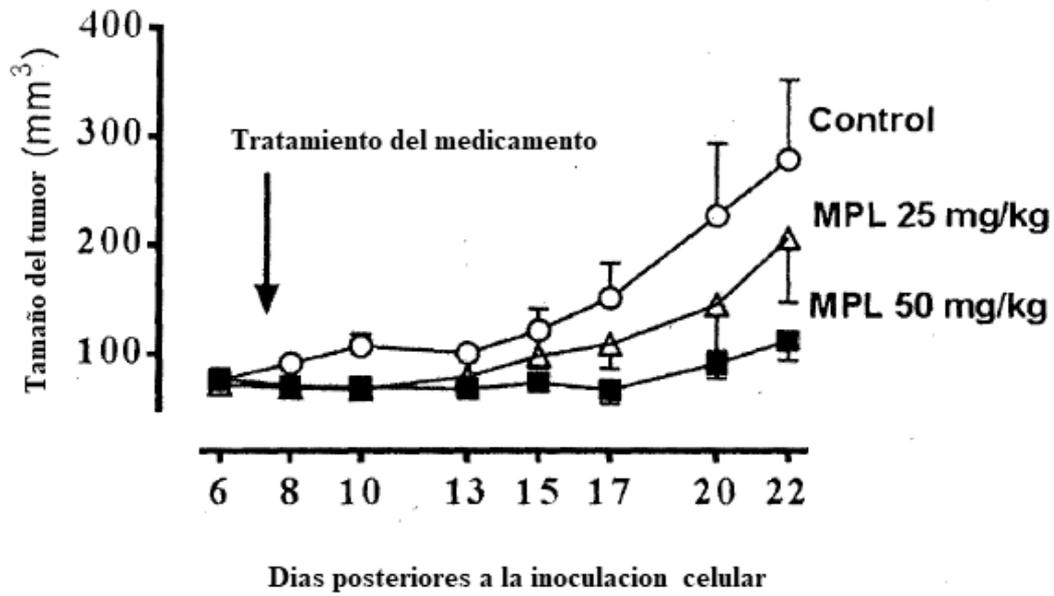


Figura 22

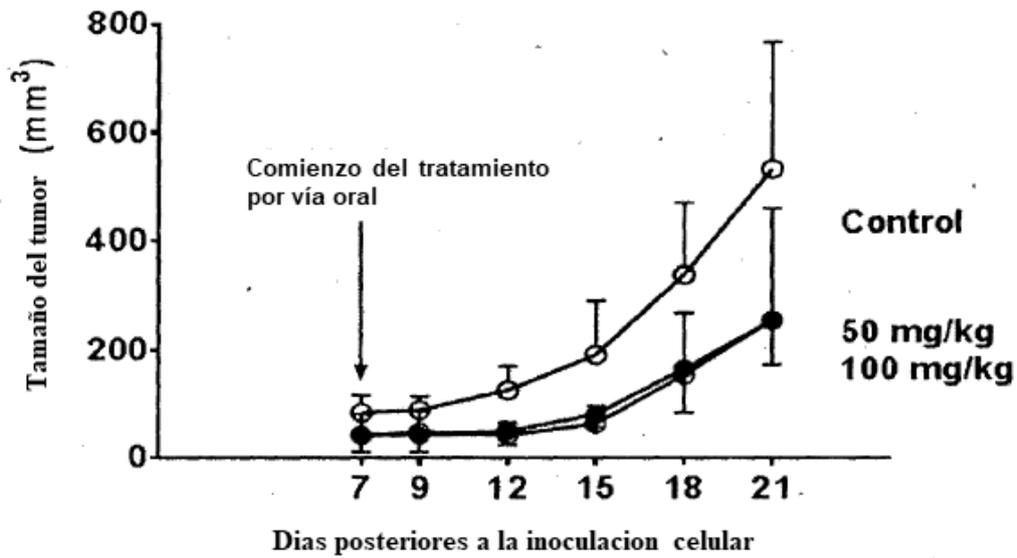


Figura 23

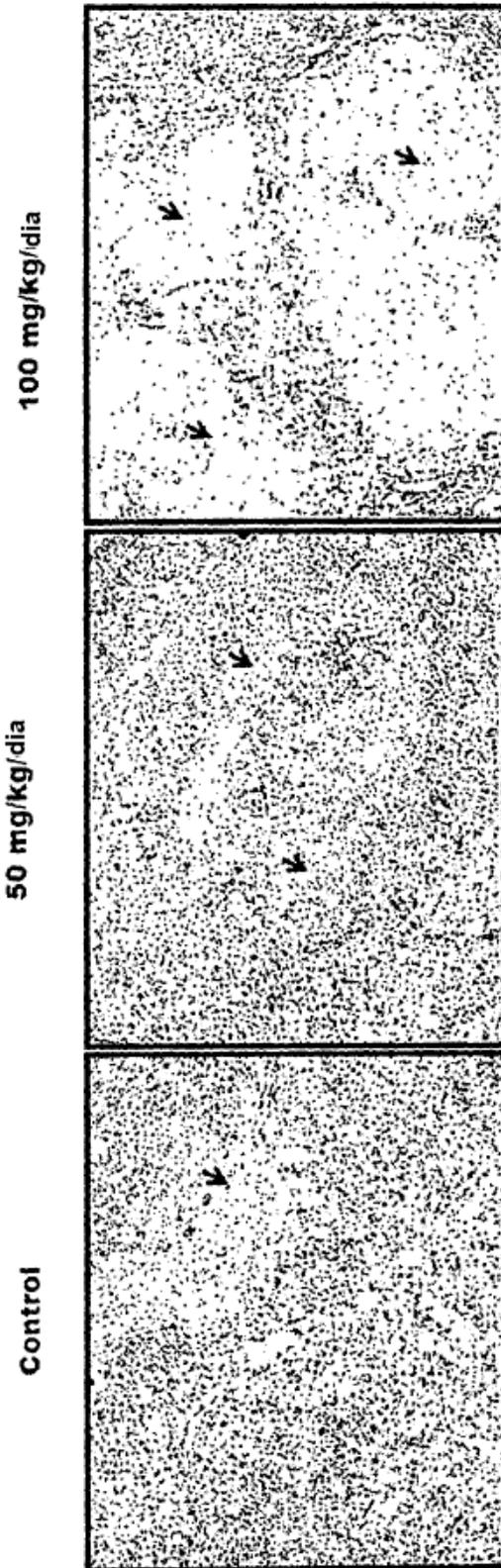


Figura 24

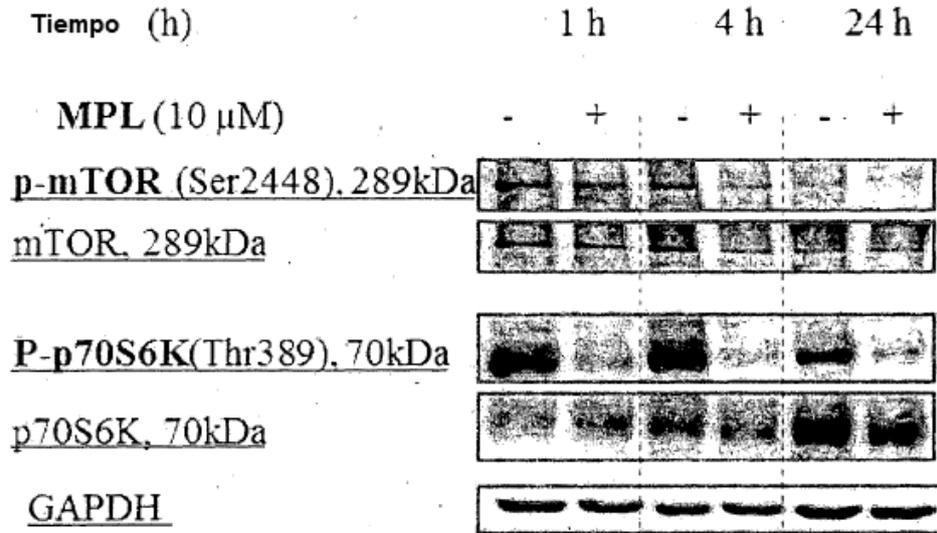


Figura 25

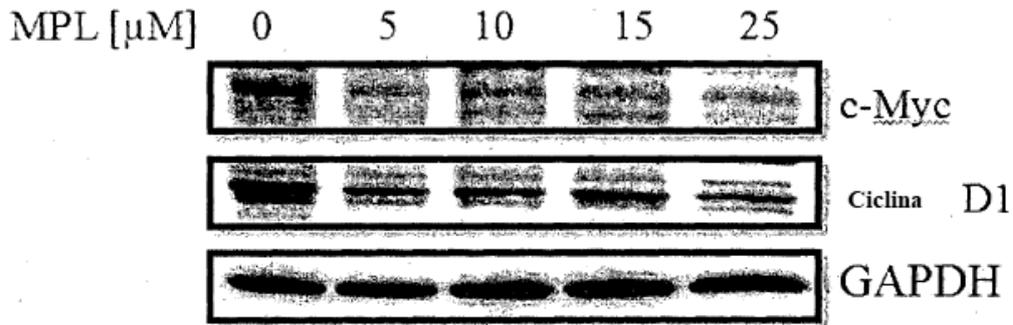


Figura 26

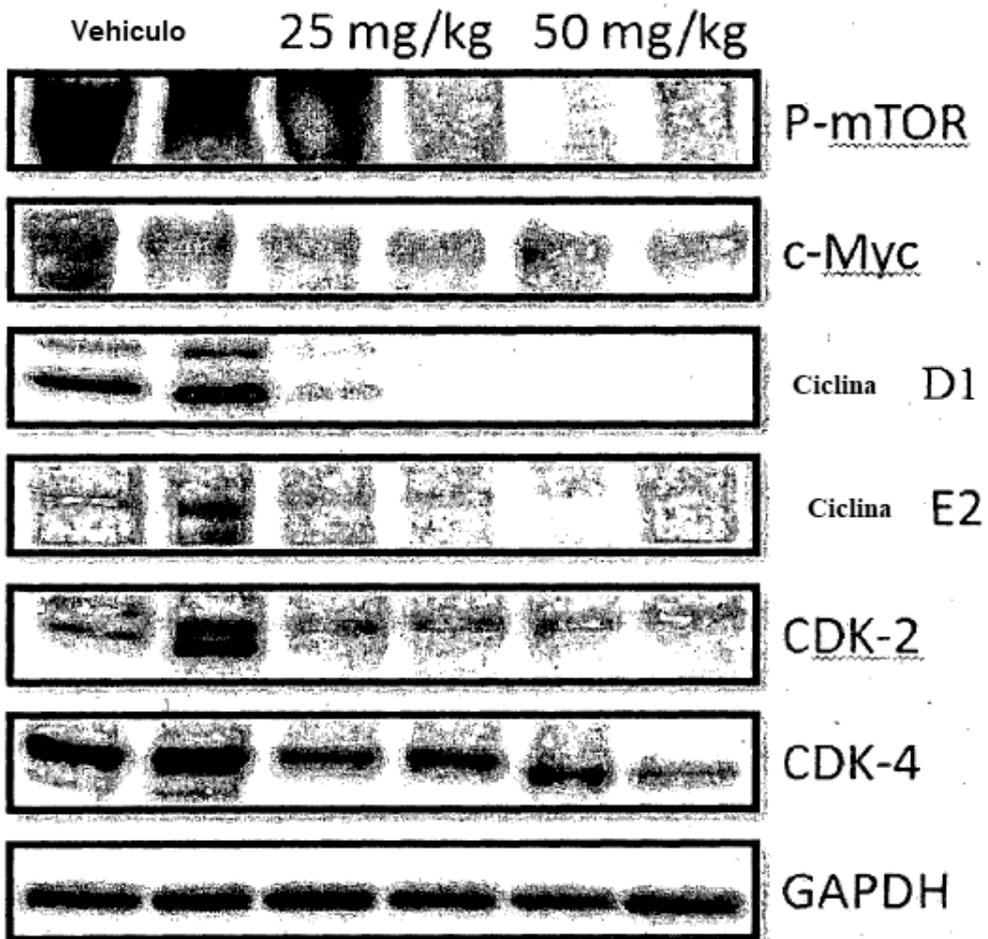


FIGURA 27A

MPL (25 $\mu$ M)	-	+	-	+
LPS (1 $\mu$ g/ml)	-	-	+	+
<b>p-NF<math>\kappa</math>B</b>				

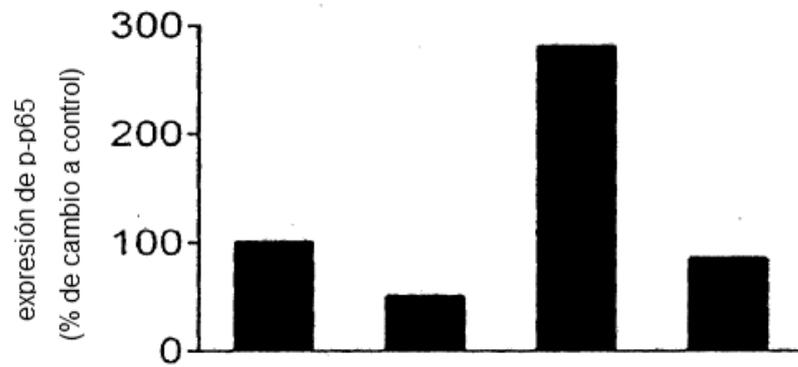


FIGURA 27B

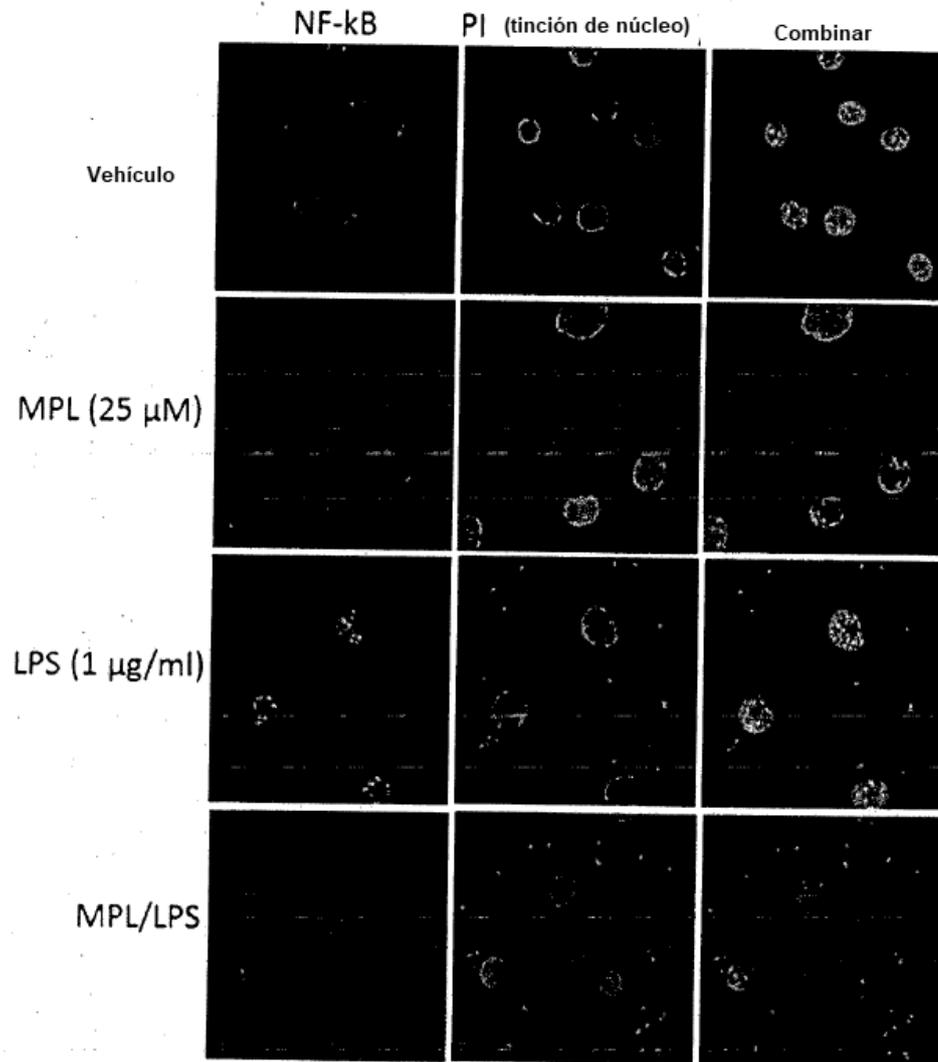


FIGURA 28

MPL (25 $\mu$ M)	-	+	-	+
LPS (1 $\mu$ g/ml)	-	-	+	+

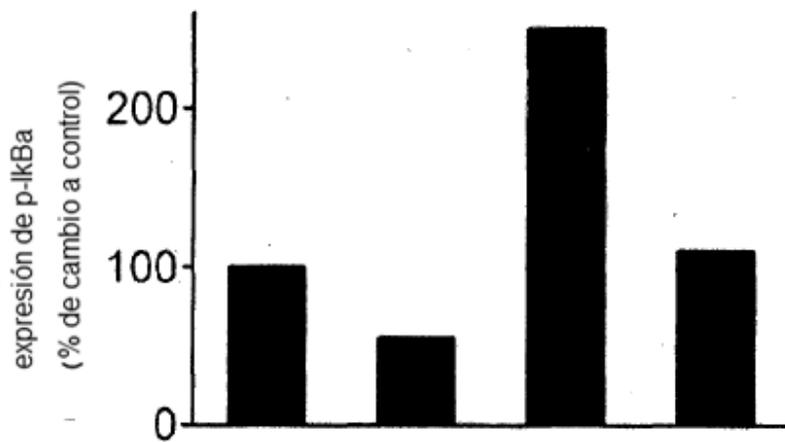


FIGURA 29

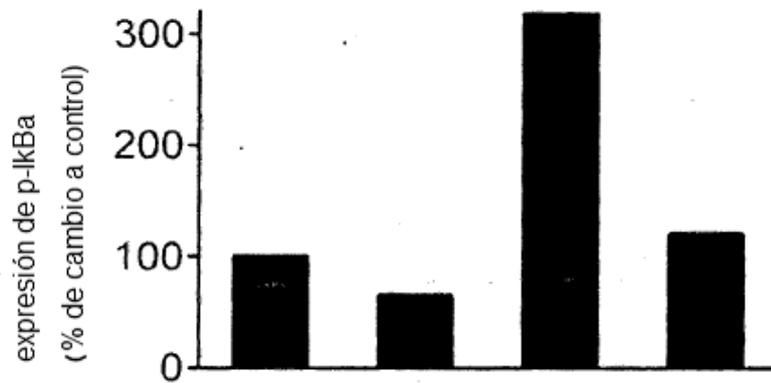
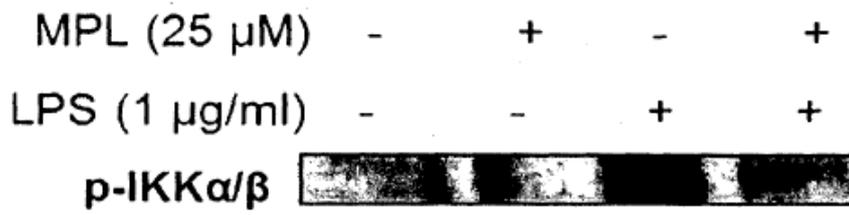


FIGURA 30

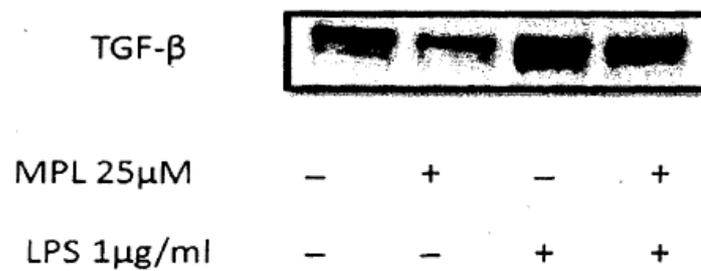


FIGURA 31

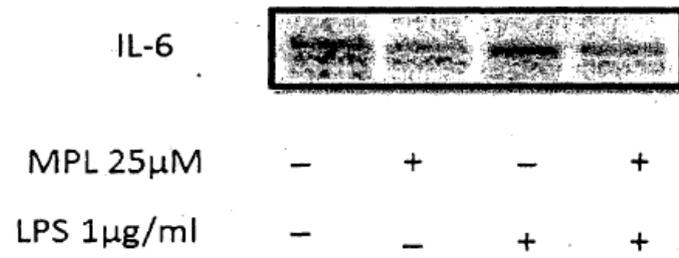


Figura 32

