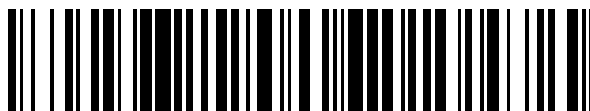


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 599**

51 Int. Cl.:

C07D 403/14 (2006.01)

C07D 403/04 (2006.01)

A61K 31/454 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2010 PCT/US2010/034748**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010 WO10132684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2010 E 10775546 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 2430016**

54 Título: **Inhibidores de leucemia inv(16)**

30 Prioridad:

13.05.2009 US 177730 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION
(100.0%)**

**250 West Main Street, Suite 300
Charlottesville, VA 22902, US**

72 Inventor/es:

**BUSHWELLER, JOHN H.;
GREMBECKA, JOLANTA;
ILLENDULA, ANURADHA y
DIXON, LAUREN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 787 599 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de leucemia inv(16)

Antecedentes

Factor de unión al centro. Los factores de unión al centro (CBF) son factores de transcripción heterodiméricos que consisten en una subunidad CBF α que se une al ADN (Runx1, Runx2 o Runx3) y una subunidad CBF β que no se une al ADN. La interrupción homocigota de *Runx1* o *Cbfb* en los ratones produce letalidad embrionaria a mitad de la gestación y un bloqueo profundo de la hematopoyesis definitiva (Okuda, van Deursen et al. 1996; Sasaki, Yagi et al. 1996; Wang, Stacy et al. 1996; Wang, Stacy et al. 1996), y se confirma que estas dos proteínas son esenciales para la hematopoyesis adecuada. Los embriones carecen de células progenitoras hematopoyéticas definitivas, eritrocitos enucleados y células de linaje mieloide maduras debido a la incapacidad de las células madre hematopoyéticas de emerger del endostio el día E10.5. Los embriones deficientes en *Runx1* carecen de actividad de células madre hematopoyéticas (CMH) trasplantables, el linaje a partir del cual se desarrollan todos los linajes diferenciados con la excepción de los eritrocitos, y se confirma que el CBF es un regulador crítico de la función de las células madre hematopoyéticas (Cai, de Bruijn et al. 2000).

Los estudios con ratones de los efectos de dosificación de *Runx1* y *Cbfb* en la hematopoyesis muestran efectos significativos con cambios modestos, incluso, en el nivel de cualquiera de las proteínas. Cambios del doble en la dosificación de *Runx1* afectan el momento de la aparición de células madre hematopoyéticas en el embrión y el número de células progenitoras comprometidas en el embrión y en el adulto (Cai, de Bruijn et al. 2000; North, de Bruijn et al. 2002; Lacaud, Kouskoff et al. 2004). Estos estudios sugieren que la dosis de *Runx1* afecta al equilibrio entre las células madre hematopoyéticas y las células progenitoras comprometidas en el embrión. De acuerdo con esto, la alteración de la dosificación de *RUNX* en los humanos está asociada a la enfermedad. El trastorno plaquetario familiar con propensión a desarrollar síndrome de LMA (TPF/LMA) es una enfermedad hereditaria que muestra alteración de la hematopoyesis (trombocitopenia y deterioro de la función plaquetaria) y un alto riesgo de desarrollar leucemia mieloide aguda (LAM) (Ho, Otterud et al. 1996; Song, Sullivan et al., 1999). Estos pacientes tienen mutaciones de pérdida de función en *RUNX1*. Además, del 3 al 5% de las leucemias esporádicas muestran mutaciones de pérdida de función en *RUNX1* (Osato, Yanagida et al. 2001).

La alteración de la dosificación de *Cbfb* también muestra defectos significativos en los compartimentos hematopoyéticos. Un estudio reciente mostró que una reducción de 3 veces en la dosificación de *Cbfb* dio como resultado una reducción del número de timocitos maduros (células T) y una reducción de 6 veces no produjo timocitos (Talebian, Li et al. 2007). Está claro que las dosificaciones de ambos *Runx1* o *Cbfb* son críticas para la hematopoyesis normal y la regulación de las CMH.

Caracterización estructural y funcional del CBF. La estructura del dominio de heterodimerización de CBF β se determinó primero mediante espectroscopia de RMN por nuestro laboratorio (Huang, Peng et al. 1999) y otros (Goger, Gupta et al. 1999). El dominio de heterodimerización de CBF β tiene un nuevo plegamiento α/β compuesto por una lámina β central muy retorcida formada por seis hojas rodeada por cuatro hélices α y una hélice 3_{10} . El análisis de perturbación por desplazamiento químico en la RMN se usó para mapear el sitio de unión para el dominio Runt de Runx1 en el CBF α (Huang, Peng et al. 1999). A partir de estos datos, llevamos a cabo una amplia mutagénesis de Ala en el CBF β para identificar los puntos calientes energéticos para la unión (Tang, Shi et al. 2000). Las estructuras cristalinas posteriores de los complejos ternarios (véase más abajo) confirmaron la importancia de esta región para la interacción con Runx1.

Nosotros y otros también determinamos la estructura del ADN y del dominio de unión a CBF β de Runx1, denominado el dominio Runt, con el uso de la RMN (Berardi, Sun et al. 1999; Nagata, Gupta et al. 1999). Los estudios estructurales del dominio Runt se llevaron a cabo con el uso de complejos entre el dominio Runt y ADN debido al mal comportamiento de las proteínas aisladas en solución (Berardi, Sun et al. 1999; Nagata, Gupta et al. 1999; Perez-Alvarado, Munnerlyn et al. 2000). El dominio Runt es una proteína de tipo sandwich β sin ninguna hélice α , como se predijo en un estudio anterior por dicroísmo circular (DC) (Crute, Lewis et al. 1996). El plegamiento identificado para el dominio Runt pertenece al plegamiento clásico de las inmunoglobulinas (Ig), específicamente el plegamiento de Ig de tipo s mejor ejemplificado por la estructura del elemento de repetición de la fibronectina. Curiosamente, este pliegue se ha identificado en los dominios de unión al ADN de varios otros factores de transcripción críticos de mamíferos, incluidos NF- κ B, NFAT, p53, STAT-1 y el dominio T. Por lo tanto, el dominio Runt pertenece a una familia de dominios de unión al ADN con relación estructural con el plegamiento de Ig de tipo s. Para todas estas proteínas con relación estructural, la unión al ADN está mediada por las regiones en lazo que conectan las diversas hojas β . Como se hizo para el CBF β , llevamos a cabo un estudio de mapeo por perturbación del desplazamiento químico para identificar el sitio de unión del CBF α en el dominio Runt (Tang, Crute et al. 2000). En función de estos datos, llevamos a cabo una extensa mutagénesis de Ala para identificar los puntos calientes energéticos para la unión del CBF β en el dominio Runt (Zhang, Li et al. 2003). También llevamos a cabo un extenso estudio de mutagénesis de Ala para identificar los puntos calientes energéticos para la unión al ADN (Li, Yan et al. 2003).

Se ha determinado la estructura cristalina de los complejos ternarios que contienen el CBF β , el dominio Runt y el ADN mediante cristalografía con rayos X (Bravo, Li et al. 2001; Tahirou, Inoue-Bungo et al. 2001). Estas estructuras han

proporcionado una gran cantidad de información detallada sobre la interacción entre el dominio Runt y el ADN, así como entre el dominio Runt y el CBF β . Como se ve en todas las otras proteínas de unión al ADN del plegamiento de Ig mencionadas anteriormente, el dominio Runt establece contactos en los surcos mayor y menor del ADN por medio de los lazos que se extienden desde un extremo del barril. Estas estructuras también muestran con claridad la ubicación y el posicionamiento de la subunidad CBF β . Como se predijo a partir de los experimentos bioquímicos, el CBF β no establece ningún contacto directo con el ADN, sino que modula la afinidad de unión del dominio Runt indirectamente, es decir, alostéricamente.

También se ha determinado la estructura cristalina del dominio Runt de Runx1 solo (Backstrom, Wolf-Watz et al. 2002; Bartfeld, Shimon et al. 2002). Un estudio por RMN anterior únicamente del dominio Runt aislado fue capaz de caracterizar el barril β , pero la escasa solubilidad y el amplio cambio que ensancha la resonancia de los residuos en los lazos de unión al ADN limitaron la caracterización estructural (Pérez-Alvarado, Munnerlyn et al. 2000). Con la adición de una estructura de alta resolución del dominio Runt aislado, la información estructural detallada está disponible para este dominio únicamente, en complejo con el CBF β o el ADN, y en un complejo ternario con el CBF β y el ADN. Esto permite que se comparen las estructuras para identificar los cambios estructurales del dominio Runt que se producen al unirse. Tanto el CBF β como el ADN inducen cambios muy similares en la estructura del dominio Runt (Backstrom, Wolf-Watz et al. 2002; Bartfeld, Shimon et al. 2002), lo que apoya el concepto de que la subunidad CBF β realmente estabiliza la conformación del dominio Runt para la unión al ADN. De hecho, hemos demostrado mediante estudios de relajación por RMN que el CBF β altera un equilibrio conformacional existente en el dominio Runt que explica cómo se logra esta regulación alostérica (Yan, Liu et al. 2004).

Leucemia de inv(16). Dos de los cuatro genes que codifican las subunidades del CBF son protooncogenes que suelen estar activados en las leucemias humanas. La subunidad RUNX1 está codificada por el gen de la *leucemia mieloide aguda 1 (AML1)* o *RUNX1* que está interrumpido por una serie de translocaciones cromosómicas (Look 1997), todas ellas asociadas a la leucemia mieloide y a la linfocítica. El gen que codifica el CBF β (*CBFB*) está interrumpido por la inversión pericéntrica del cromosoma 16 [inv(16)(p13q22)], y con menos frecuencia por la t(16;16)(p13q22), asociada al 100% de los subtipos AML-M4Eo (Liu, Tarle et al. 1993), lo que da como resultado una proteína de fusión que contiene la mayor parte de la proteína CBF β (165 aminoácidos del extremo amino) fusionada a la región de la cola superenrollada de la cadena pesada de miosina del músculo liso (SMMHC, por su nombre en inglés) (véase la figura 1). La inv(16) está asociada a ~12% de las leucemias mieloides agudas *de novo* en los humanos (Look 1997). La proteína de fusión CBF β -SMMHC actúa como un represor dominante de la función de CBF (Liu, Tarle et al. 1993), de la unión de RUNX1 y de la desregulación de la expresión de muchos genes necesarios para la hematopoyesis normal.

Los ratones heterocigotos para un alelo *Cbfb-MYH11* genosuprimido mostraban un fenotipo muy similar al observado para la genosupresión completa de Runx1 o CBF β , a saber, la letalidad el día embrionario 12 acompañada de hemorragia y un bloqueo grave en la hematopoyesis definitiva (Castilla, Wijmenga et al. 1996). Los embriones heterocigotos que expresan una copia de CBF β -SMMHC y una copia de CBF β mostraron un fenotipo muy similar al observado para la genosupresión completa de Runx1 o CBF β , es decir, la letalidad el día 12 con hemorragias graves y un bloqueo completo del desarrollo hematopoyético. Un análisis posterior mostró que la presencia de CBF β -SMMHC bloquea específicamente la maduración de los linajes linfoides y mieloides. Estos datos confirman con claridad que CBF β -SMMHC es un inhibidor negativo dominante de la función de CBF.

Estudios previos han demostrado que CBF β -SMMHC es necesario, pero no suficiente, para provocar la leucemia en los modelos de ratón. En los estudios realizados por el Dr. Lucio Castilla, los ratones quiméricos generados a partir de células madre embrionarias *Cbfb^{Cbfb-MYH11/+}* demostraron estar altamente predispuestos al desarrollo de LMA tras el tratamiento con mutagénesis química (ENU) o retroviral (Castilla, Garrett et al. 1999) (Castilla, Perrat et al. 2004). La morfología observada de estos ratones se parece muchísimo a la observada en los pacientes con AML-M4Eo. En un estudio más reciente en el laboratorio del Dr. Castilla se utilizó una genosupresión condicional *Cbfb^{Cbfb-MYH11/+}* en los ratones para demostrar que la activación de la expresión de CBF β -SMMHC en la médula ósea induce la acumulación de células progenitoras mieloides que se transforman en leucemia completa al cabo de 3 a 5 meses (Kuo, Landrette et al. 2006). Todos estos estudios demuestran con claridad que CBF β -SMMHC es esencial para la leucemiogénesis inv(16) y apoyan firmemente que la inhibición dirigida de esta proteína de fusión tendría valor terapéutico.

En los pacientes con leucemia inv(16), las células leucémicas presentan con frecuencia otras mutaciones que podrían entrar en sinergia en la leucemiogénesis. Las mutaciones más habituales son mutaciones activadoras en la tirosina cinasa de los receptores c-Kit y FLT3 (Reilly 2005). Esto concuerda bien con la (al menos) "hipótesis del doble impacto" (Dash y Gilliland 2001; Gilliland y Tallman 2002) que postula que la leucemia requiere una combinación de una mutación que bloquea la diferenciación y una segunda que mejora la proliferación. Los impactos que bloquean la diferenciación a menudo ocurren en factores de transcripción, como la creación de la proteína de fusión CBF β -SMMHC, mientras que los que mejoran la proliferación a menudo implican mutaciones que crean un receptor con actividad tirosina cinasa activado con independencia del ligando o de la vía RAS asociada. Este punto de vista está apoyado por un estudio reciente en el que se mostró la cooperación entre la inv(16) y la FLT3-ITD, la forma activada de FLT3 (Kim, Klug *Blood* 2008). Curiosamente, el análisis molecular de las muestras de LMA de humano en el momento del diagnóstico y la recidiva indican que estas mutaciones secundarias no siempre están presentes en la recidiva, lo que sugiere con firmeza que, aunque la inv(16) puede ocurrir en las CMH, la mutación FLT3-ITD puede surgir en las células progenitoras posteriores.

Mecanismo de la leucemiogénesis mediada por CBF β -SMMHC. La expresión de CBF β -SMMHC en las células cultivadas da como resultado una alteración de la localización celular de Runx1. Normalmente, Runx1 muestra localización nuclear, pero cuando se coexpresa con CBF β -SMMHC, tanto Runx1 como CBF β -SMMHC se encuentran sobre todo en el citoplasma (Lu, Maruyama et al., 1995; Liu, Wijmenga et al. 1996; Adya, Stacy et al. al. 1998; Kanno, Kanno et al. 1998). Estos resultados conforman la base de uno de los mecanismos propuestos de la actividad negativa dominante de CBF β -SMMHC, a saber, que CBF β -SMMHC secuestra la Runx1 en el citoplasma, con lo que se evita así que llegue al núcleo (revisado en Shigesada, van de Sluis et al., 2004). La coimmunoprecipitación ha demostrado que la cola del extremo carboxilo de CBF β -SMMHC que incluye un dominio para la capacidad de ensamblaje (DCE) se une a varias proteínas involucradas en la represión transcripcional, incluidas mSIN3 y las HDAC (Lutterbach, Hou et al. 1999; Durst, Lutterbach et al., 2003). En función de estos resultados, se ha propuesto un segundo modelo para la actividad negativa dominante de CBF β -SMMHC, en el que CBF β -SMMHC actúa sobre el promotor como represor transcripcional mediante el reclutamiento de correpresores específicos (revisado en Hiebert, Lutterbach et al., 2001).

Es importante destacar que ninguno de los ratones *Runx1^{+/-}* ni *Cbfb^{+/-}* exhiba los drásticos defectos hematopoyéticos asociados al alelo genosustituido *CBFB-MYH11* (Castilla, Wijmenga et al. 1996; Okuda, van Deursen et al. 1996; Sasaki, Yagi et al. 1996; Wang, Stacy et al. 1996; Wang, Stacy et al. 1996). Ninguno de los dos modelos mencionados más arriba explicó cómo se pierde más de la mitad de la actividad normal de Runx1-CBF β . Nuestra hipótesis fue que CBF β -SMMHC inactivó más del 50% de la función de Runx1-CBF β debido a la alteración de su afinidad por Runx1. Gracias al uso de la calorimetría de titulación isotérmica, demostramos que CBF β -SMMHC se une con una fuerza unas 10 veces mayor al dominio Runt de Runx1 que el CBF β de tipo silvestre (Lukasik, Zhang et al. 2002). Los estudios por RMN de un complejo entre un dominio CBF β -SMMHC funcional y el dominio Runt muestran que el dominio Runt en este complejo está en contacto tanto con la porción CBF β de la proteína como con una región específica en el dominio SMMHC. Estos resultados demuestran que la mayor afinidad de CBF β -SMMHC por Runx1 contribuye a la interrupción de la hematopoyesis normal.

Más recientemente, también hemos demostrado que CBF β -SMMHC inhibe la unión al ADN del dominio Runt, lo que proporciona otra capa de inhibición de la actividad de Runx. En concordancia con esto, los estudios previos han demostrado que disminuye la unión de RUNX al promotor de MPO (Cao, Britos-Bray et al. 1997) y al promotor de INK4b (Markus, Garin et al. 2007) en presencia de CBF β -SMMHC. Todos los estudios funcionales establecen con claridad que la unión de CBF β -SMMHC al dominio Runt de RUNX1 es esencial para su función y, por lo tanto, hace que sea una diana apropiada para la inhibición.

Función de inv(16) en las propiedades de las células madre de la leucemia. Los pacientes con LMA inv(16) suelen estar sometidos a tratamientos agresivos de quimioterapia con fármacos citotóxicos, como Ara-C y antramicina. Este tratamiento lo toleran mejor los pacientes jóvenes, que muestran una supervivencia global a los 5 años del 45% al 65% (Ravandi, Burnett et al. 2007; Pulsoni, Iacobelli et al. 2008). Sin embargo, la mayoría de los pacientes son mayores y la supervivencia general a los 5 años para los pacientes mayores de 60 años es de aproximadamente el 20% (Farag, Archer et al. 2006). Estos datos indican claramente que son esenciales los tratamientos dirigidos que pueden mejorar la respuesta terapéutica para los pacientes con LMA inv(16).

La bibliografía más reciente sugiere que la incapacidad para curar los cánceres con los tratamientos actuales, que incluyen la quimioterapia citotóxica, los inhibidores de cinasas o los anticuerpos monoclonales, puede atribuirse a que una población de las llamadas células madre del cáncer o células iniciadoras del cáncer son resistentes al tratamiento, están en reposo, tienen la capacidad de autorrenovarse a largo plazo, y puede recapitular completamente el fenotipo tumoral en el momento de la recidiva. La LMA inv(16) es un buen ejemplo de este fracaso porque los pacientes con la inv(16) muestran invariablemente, en el momento de la recidiva, la reorganización inv(16), aunque en la recidiva se puedan detectar, o no, otras mutaciones (RAS, FLT3-ITD o KIT) que se detectaron en el diagnóstico (Nakano, Kiyoi et al. 1999; Kottaridis, Gale et al. 2002; Shih, Liang et al. 2008).

Debido a la función crítica de CBF β y RUNX1 en la regulación de las células madre hematopoyéticas, la desregulación de esta vía por CBF β -SMMHC (u otras proteínas de fusión de CBF, tales como AML1-ETO o TEL-AML1), conducirá a las propiedades de las células madre del cáncer mencionadas más arriba, tal como la capacidad de autorrenovación a largo plazo. Además, el análisis por micromatrices de las leucemias con CBF indica que está alterado el nivel de las proteínas involucradas en la reparación del ADN (Alcalay, Orleth et al. 2001; Xu, Li et al. 2007), lo que conduce a un aumento de la tasa de mutagénesis y a un probable aumento de la tasa de adquisición de mutaciones secundarias, tales como las encontradas en c-Kit y FLT3 que se ha demostrado que aceleran la leucemiogénesis. Como la recidiva de la LMA inv(16) está invariablemente acompañada de un aumento de las células inv(16)⁺ positivas, se cree que la recidiva es el resultado de un fracaso del tratamiento para erradicar las células madre de la leucemia. Además, la observación de que un paciente diagnosticado con la LMA inv(16) recidivó posteriormente con una leucemia de lincofictos pro-B inv(16)⁺, sugiere que la reorganización inv(16) se había producido en una célula progenitora multipotente/célula madre con reducción de la capacidad de proliferación (Boeckx, van der Velden et al. 2004).

Inhibidores de la interacción proteína-proteína (IPP). Las interacciones proteína-proteína desempeñan una función crítica en todos los aspectos de la señalización en la célula. En términos de su importancia biológica, son dianas muy atractivas. Sin embargo, hasta hace poco se consideraba que las interacciones proteína-proteína no se podían modificar con fármacos, es decir, que serían dianas con una probabilidad muy baja de éxito. Este punto de vista se basaba en la enorme área específica y la falta de curvatura, o sea, bolsillos a los que se pueden unir moléculas

pequeñas, que se suelen encontrar en tales interfases proteicas. Ese punto de vista está cambiando rápidamente a medida que se describen cantidades crecientes de tales inhibidores (Cochran 2000; Toogood 2002; Veselovsky, Ivanov et al. 2002; Gadek y Nicholas 2003; Fry 2006). De hecho, una revisión reciente recogió 17 dianas para las que se han desarrollado dichos inhibidores (Gadek y Nicholas 2003).

5 Las interacciones proteína-proteína desempeñan una función particularmente importante en la regulación de la transcripción, donde el ensamblaje de los complejos proteína-proteína apropiados es esencial para la regulación génica apropiada. Con ese fin, la inhibición de las interacciones proteína-proteína en las que intervienen factores de transcripción es muy probable que acaben alterando la expresión génica y, gracias a ello, el perfil de expresión de las células cancerosas (Arndt 2006). Una historia de éxito reciente a este respecto es el desarrollo de inhibidores de la
10 interacción MDM2-p53. La unión de MDM2 a p53 conduce al refuerzo de la degradación de p53 en el proteasoma. Se observan niveles elevados de MDM2 en varios tipos de cáncer. Roche desarrolló inicialmente un inhibidor muy potente de esta interacción (Vassilev, Vu et al. 2004) y otros han desarrollado otros inhibidores (Shangary, Qin et al. 2008). Se ha demostrado que estos inhibidores anulan los efectos de la dosis reducida de p53 o de p53 mutante al inhibir esta interacción gracias a lo cual aumenta la cantidad de p53 en las células y mejora la apoptosis mediada por p53
15 (Vassilev, Vu et al. 2004; Tovar, Rosinski et al. 2006; Efeyan, Ortega-Molina et al., 2007). Estos resultados demuestran que resulta factible actuar selectivamente sobre las interacciones proteína-proteína con moléculas pequeñas y proporciona la validación de nuestra propuesta de desarrollar inhibidores de la interacción entre CBF β -SMMHC y RUNX.

Tratamiento dirigido contra la leucemia. El objetivo general de los tratamientos dirigidos contra la leucemia es utilizar
20 nuestro conocimiento de los programas celulares asociados a la patología de la leucemia para diseñar tratamientos con un índice terapéutico notablemente mejorado. La mayoría de estos estudios en el campo de la leucemia se han centrado en actuar selectivamente sobre componentes activados de la vía de señalización del receptor de citocinas. Un ejemplo clásico en la leucemia es la molécula pequeña imatinib, que actúa selectivamente sobre el bolsillo del ATP de la cinasa ABL, con lo que se bloquea la actividad de la tirosina cinasa de BCR-ABL en la leucemia mielógena crónica (Druker 2004; Lydon y Druker 2004). El uso del imatinib ha mejorado drásticamente el tratamiento de la LMC.
25 Los inhibidores de segunda generación, tal como el dasatinib, también son eficaces contra la LMC resistente al imatinib. Sin embargo, la aplicación de esta estrategia a otras leucemias ha sido hasta ahora menos fructífera. Se están realizando ensayos clínicos en la actualidad para evaluar el índice terapéutico de los inhibidores de otros componentes de las vías del receptor de citocinas comprometidas en las leucemias, tal como los inhibidores del receptor FLT3 activado (CEP-701, MLN 518 y PKC 412) y de la cinasa de JAK2, aunque no está claro si estos inhibidores mostrarán una mejora significativa en el índice terapéutico.
30

Sigue echándose en falta la identificación de moléculas que inhiben los oncogenes de fusión en la LMA, que de este modo anulan el bloqueo en la diferenciación e inducen la apoptosis. Estudios previos de tratamientos dirigidos revelan
35 dos aspectos que son críticos en el desarrollo de un fármaco eficaz: 1) la molécula debe inhibir la función oncogénica e inducir la diferenciación o la muerte celulares con una alteración mínima de las células progenitoras hematopoyéticas normales y 2) el fármaco debe dirigirse eficazmente a las células madre quiescentes de la leucemia, no solo las células en proliferación derivadas de las CML.

Hace mucho que en la técnica se necesitan composiciones y métodos útiles para prevenir y tratar la leucemia mieloide aguda, particularmente la debida a la fusión inv(16). La presente invención satisface estas necesidades.

40 Los siguientes documentos pueden ser útiles para comprender la invención.

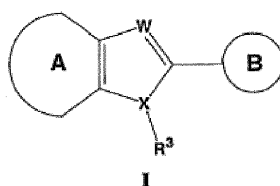
CLAUDE PIGUET ET AL: "Self-assembly and photophysical properties of lanthanide dinuclear triple-helical complexes", Journal of the American Chemical Society, vol. 115, n.º. 18, 1 de septiembre de 1993 (1993-09-01), páginas 8197-8206 analiza el autoensamblaje y las propiedades fotofísicas de los complejos triplehelicoidales dinucleares lantánidos.

45 CAO HONGYU ET AL: "Non-nucleoside inhibitors of NS5B polymerase binding to allosteric", Current Medicinal Chemistry, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS BV, BE, vol. 15, n.º. 15, 1 de enero de 2008 (01-01-2008), páginas 1462-1477 analiza las proteínas víricas no estructurales (NS5B) que se han convertido en una diana atractiva para las investigaciones en las que se descubren fármacos antivíricos para el virus de la hepatitis C.

50 BEAULIEU P L ET AL: "Non-nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase: Discovery and preliminary SAR of benzimidazole derivatives", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, PERGAMON, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 14, n.º. 1, 1 de enero de 2004 (2004-01-01), páginas 119-124 analiza los derivados de la benzimidazol-5-carboxamida de una colección para detección combinatoria que se descubrieron como inhibidores específicos de la polimerasa NS5B del virus de la hepatitis C (VHC).

55 TSUKAMOTO G ET AL: "Synthesis and anti-inflammatory activity of some 2-(substituted-pyridinyl)benzimidazoles", Journal of Medicinal Chemistry, American Chemical Society, EE. UU., vol. 23, n.º 7, 1 de julio de 1980 (1980-07-01), páginas 734-738 analiza la síntesis y la actividad antiinflamatoria de algunos 2-(sustitución piridinílica)benzimidazoles.

El documento WO 03/066629 A2 se refiere a los compuestos de fórmula I



útiles como inhibidores de las proteína cinasas GSK-3 y Lck. También se analizan las composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden los compuestos y métodos con los que utilizar esas composiciones en el tratamiento y la prevención de diversos trastornos, tales como diabetes, enfermedad de Alzheimer y rechazo de trasplantes.

La solicitud de patente internacional WO 96/40145 A1 da a conocer métodos para tratar *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* en un sujeto que necesita dicho tratamiento. Los métodos comprenden administrar al sujeto un bis-bencimidazol dicatónico en una cantidad eficaz para tratar las afecciones.

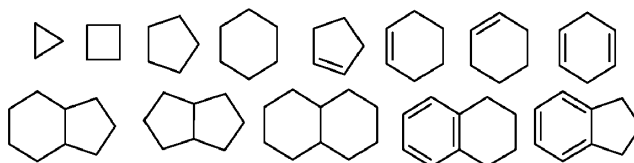
Compendio de la invención

Cualquier posibilidad de erradicar la población de células madre de la leucemia y, por lo tanto, lograr una mejor supervivencia a largo plazo para los pacientes con leucemia debe centrarse en la inhibición de la actividad del oncogén específico que impulsa las propiedades de las células madre de la leucemia. La presente invención da a conocer esquemas sintéticos y compuestos derivados durante el desarrollo de inhibidores dirigidos a CBF β -SMMHC como una estrategia terapéutica más eficaz para la leucemia inv(16). Debido a que la interacción de CBF β -SMMHC con el dominio Runt de RUNX1 es esencial para su actividad, el objeto de la presente solicitud es desarrollar inhibidores de esta interacción proteína-proteína.

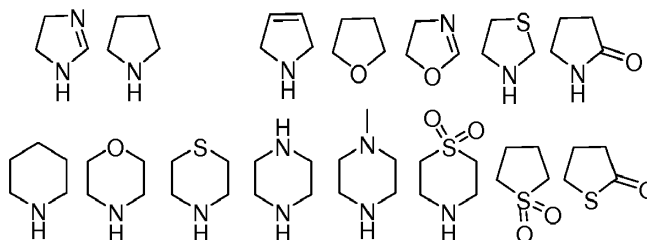
El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier otro asunto en la presente descripción que no aparezca en las reivindicaciones se presenta con fines comparativos o de referencia para la comprensión de la descripción y no forma parte de la invención.

Los términos halo, alquilo, etc., como se pueden usar en esta descripción, se elaboran de la siguiente manera:

- El término halo representa cloro, flúor, bromo o yodo, y también grupos perhaloalquilo, que incluyen, entre otros, -CF₃, -CF₂H y CH₂CF₃.
- Alquilo se refiere a grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que vienen de metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *tert*-butilo, etc.
- Cicloalquilo se refiere a un carbociclo saturado o parcialmente saturado, monocíclico, policíclico y espiropolicíclico que tiene de 3 a 6 átomos por carbociclo. Los ejemplos ilustrativos de grupos cicloalquilo que siguen en los restos unidos adecuadamente incluyen:

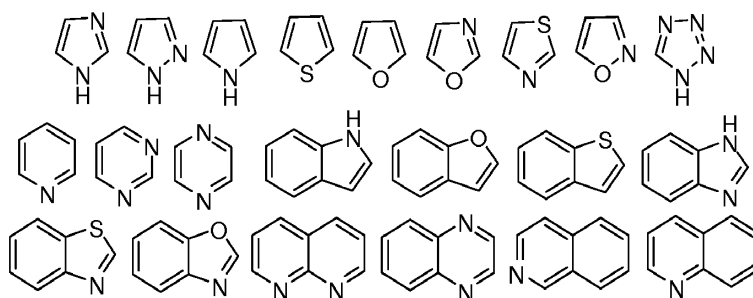


- El término heterocicloalquilo se refiere al anillo monocíclico que está saturado o parcialmente saturado y tiene de 4 a 7 átomos seleccionados de átomos de carbono y hasta dos heteroátomos como nitrógeno, azufre y oxígeno, carbociclo monocíclico, policíclico y espiropolicíclico que tiene de 3 a 6 átomos por carbociclo. Los ejemplos ilustrativos en forma de restos unidos adecuadamente incluyen:



- El término heteroarilo se refiere a heterociclo aromático monocíclico, bicíclico fusionado o policíclico que consiste en átomos de anillo seleccionados de átomos de carbono y hasta cuatro heteroátomos como

nitrógeno, azufre y oxígeno. Los ejemplos ilustrativos de anillos heterocíclicos en forma de restos unidos adecuadamente incluyen:

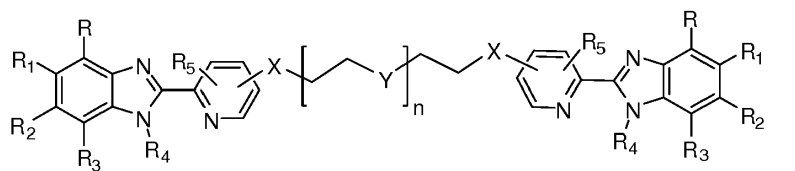


5

Los ejemplos enumerados de cicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroarilo anteriores no están limitados y también se pueden considerar especies adicionales dentro del alcance de los términos definidos.

La presente invención da a conocer compuestos diméricos que tienen la fórmula:

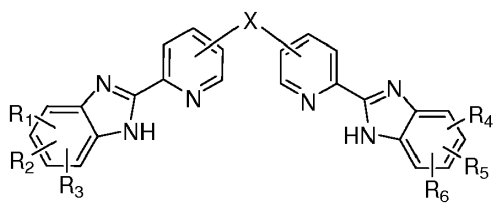
Formula 2



10 definida en la reivindicación 3.

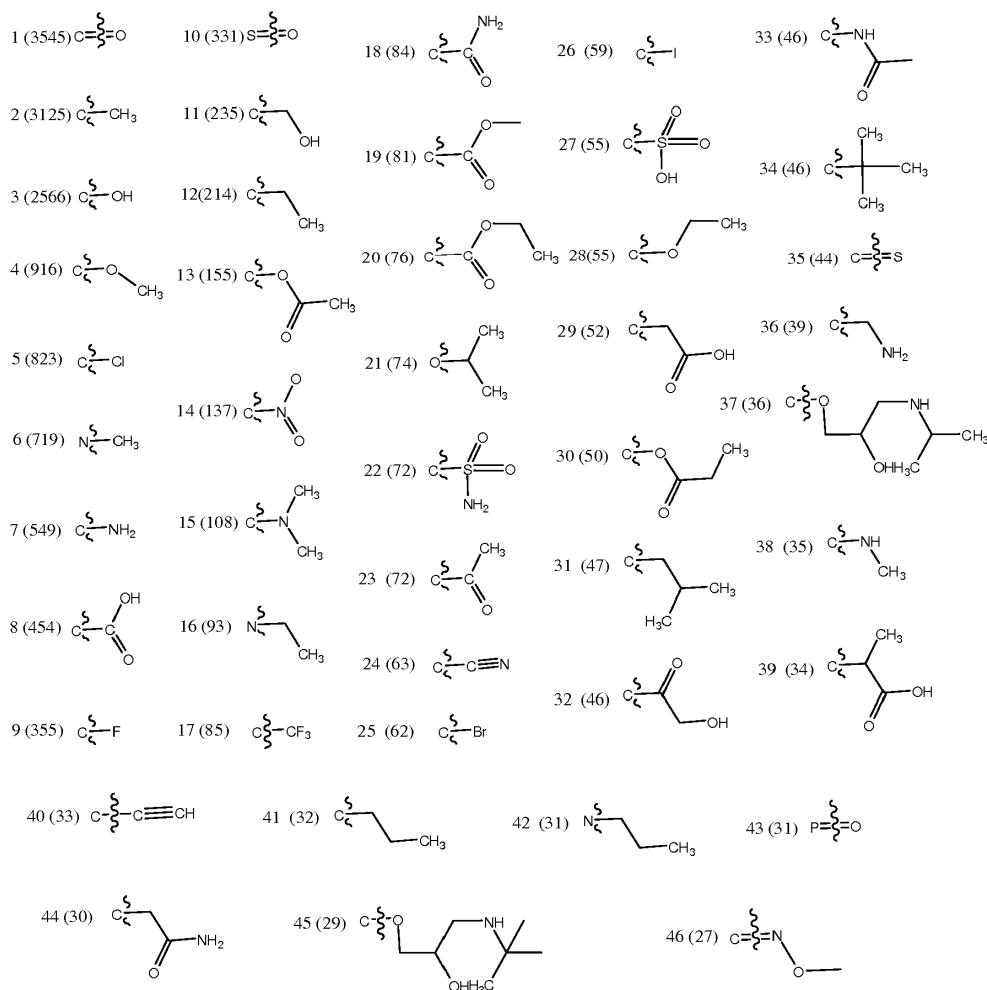
En una realización, un dímero de la invención tiene la siguiente fórmula:

Formula 7



como se define en la reivindicación 1.

Las cadenas laterales útiles incluyen, pero no se limitan a:



En un aspecto, la leucemia es leucemia humana.

Los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento de la leucemia. Un experto en la materia apreciará que se pueden agregar otros agentes terapéuticos al tratamiento.

5 La presente descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la invención.

La inv(16), que se encuentra en el 12% de los casos de LMA, da como resultado la fusión del CBFβ a una porción de la SMMHC, y se produce la proteína de fusión CBFβ-SMMHC. La unión de esta proteína de fusión a RUNX1 conduce a la desregulación del programa transcripcional necesario para la diferenciación de las células mieloides y el desarrollo de la leucemia. Debido a la importancia de la interacción proteína-proteína entre CBFβ-SMMHC y RUNX1 para la leucemioogénesis, nos hemos centrado en esta interacción para el desarrollo de inhibidores de tipo moléculas pequeñas.

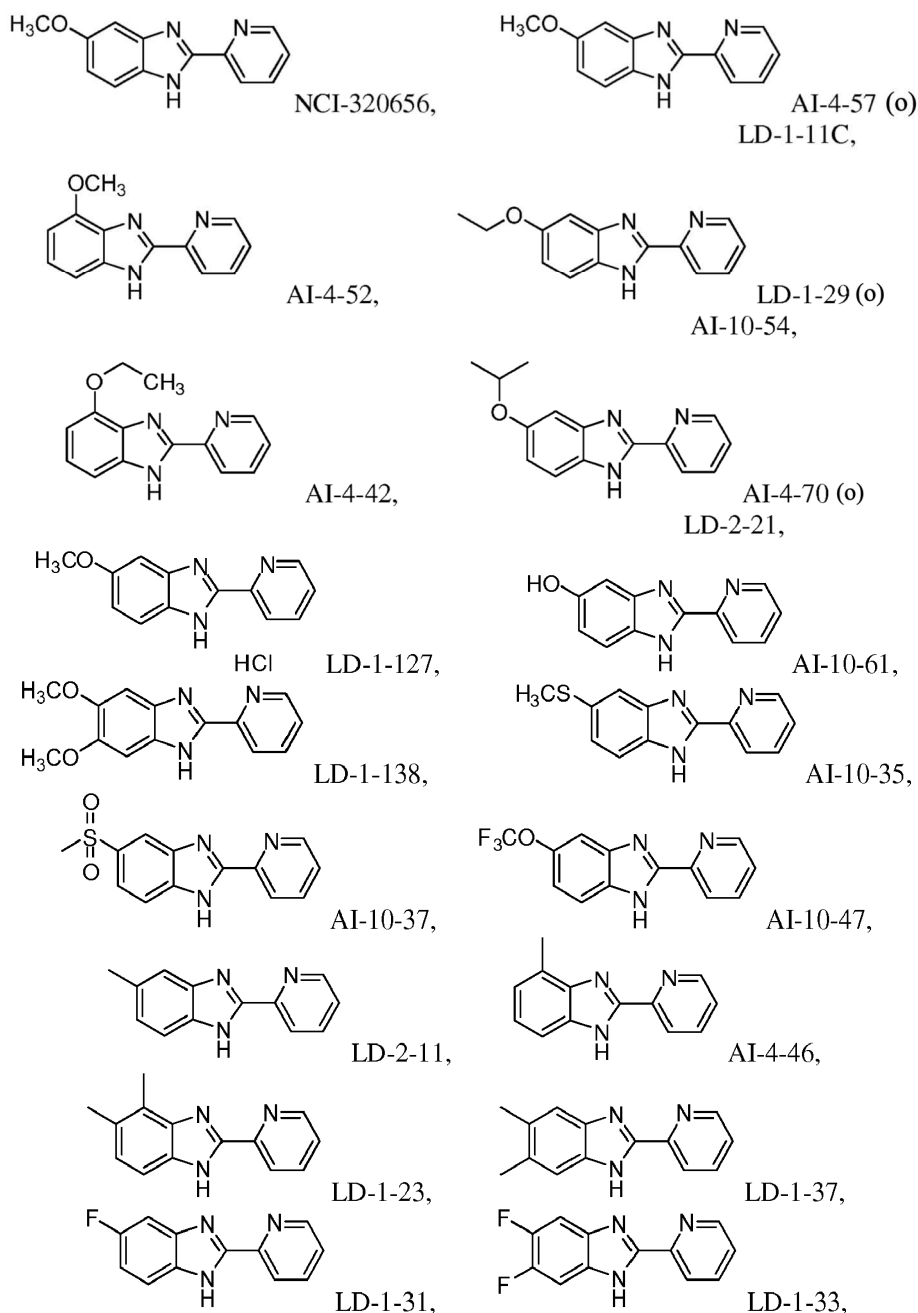
15 Hemos desarrollado moléculas pequeñas inhibidoras de la interacción proteína-proteína entre CBFβ-SMMHC y el dominio Runt de RUNX1 que se unen a la porción CBFβ de CBFβ-SMMHC. Estos compuestos muestran la inhibición del crecimiento y el incremento de la apoptosis de las líneas celulares que albergan la translocación inv(16) y poco efecto sobre las líneas celulares que no llevan inv(16). Además, hemos desarrollado inhibidores de CBFβ-SMMHC que muestran selectividad por la proteína de fusión CBFβ-SMMHC sobre el CBFβ de tipo silvestre. Estos inhibidores muestran un incremento de la potencia contra las líneas celulares con inv(16) y ningún efecto sobre las líneas celulares que no llevan inv(16).

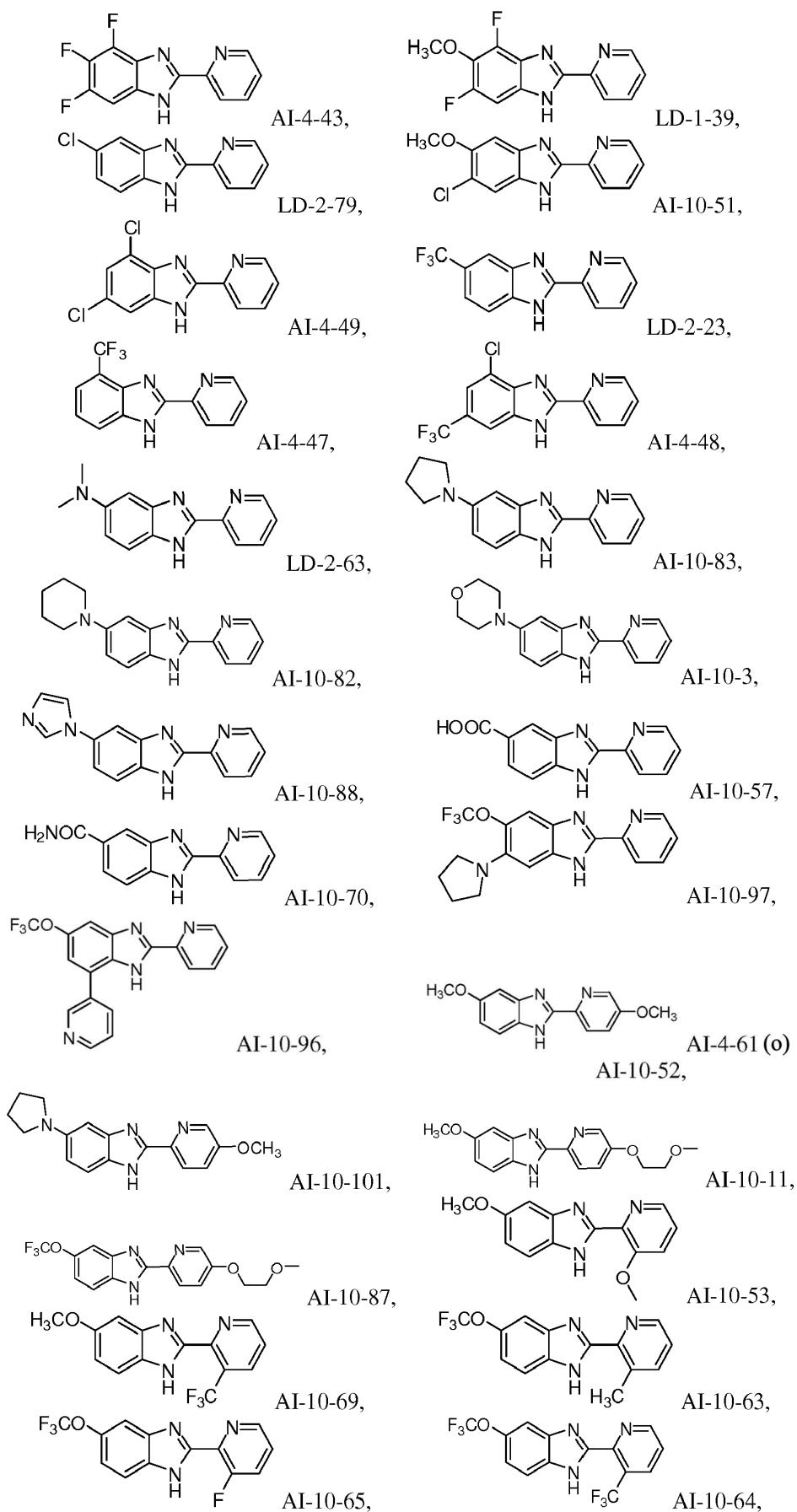
20 Actualmente, la quimioterapia citotóxica estándar se usa para el tratamiento de la leucemia inv(16). Si bien la toleran razonablemente bien los pacientes más jóvenes, no la tolera bien la población de pacientes predominantemente mayores afectados por esta enfermedad. Más importante aún, aproximadamente el 60% de los pacientes con inv(16) recidivan y mueren en menos de 5 años, lo que indica que la tasa de recidiva es significativa. Esto es casi seguro que se debe a que no se erradica la población de células madre de la leucemia cuando se trata con la quimioterapia estándar, lo que permite que la enfermedad vuelva a aparecer. Como se sabe que CBFβ-SMMHC cambia el perfil de expresión génica de las células a algo más parecido a las células madre, está claro que CBFβ-SMMHC es un impulsor

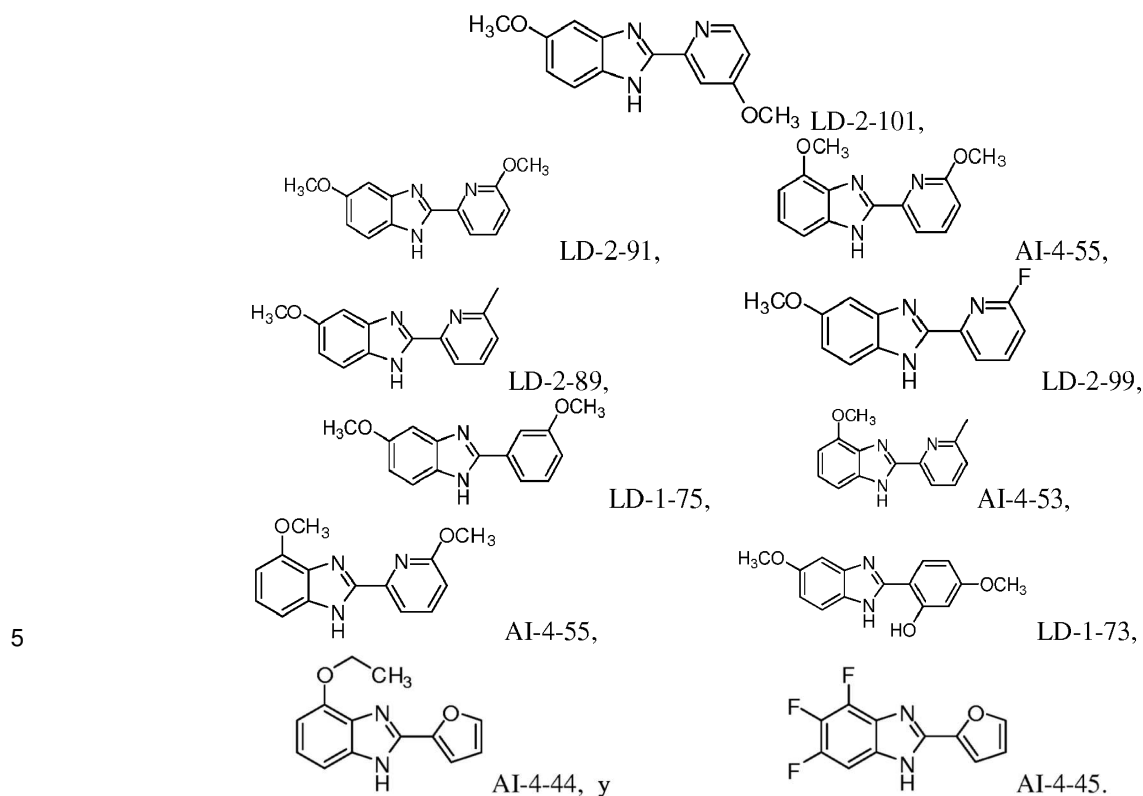
del fenotipo de células madre de la leucemia. Por lo tanto, es muy probable que la inhibición directa de la acción de CBF β -SMMHC pueda alterar este perfil de expresión y, por lo tanto, sea una estrategia terapéutica más eficaz, ya sea en monoterapia o en politerapia con la quimioterapia citotóxica.

Los compuestos monoméricos útiles (no reivindicados en esta solicitud) descritos en la presente memoria (véase la tabla 1) incluyen: NCI-320656, AI-4-57 (LD-1-11C), AI-4-52, LD-1-29 (AI-10-54), AI-4-42, AI-4-70 (LD-2-21), LD-1-127, AI-10-61, LD-1-138, AI-10-35, AI-10-37, AI-10-47, LD-2-11, AI-4-46, LD-1-23, LD-1-37, LD-1-31, LD-1-33, AI-4-43, LD-1-39, LD-2-79, AI-10-51, AI-4-49, LD-2-23, AI-4-47, AI-4-48, LD-2-63, AI-10-83, AI-10-82, AI-10-3, AI-10-88, AI-10-57, AI-10-70, AI-10-97, AI-10-96, AI-4-61 (AI-10-52), AI-10-101, AI-10-11, AI-10-87, AI-10-53, AI-10-69, AI-10-63, AI-10-65, AI-10-64, LD-2-101, AI-10-77, LD-2-91, AI-4-55, LD-2-89, LD-2-99, LD-1-75, AI-4-53, AI-4-55, LD-1-73, AI-4-44 y AI-4-45.

Los compuestos monoméricos descritos (pero no reivindicados) en la presente memoria tienen las siguientes estructuras:

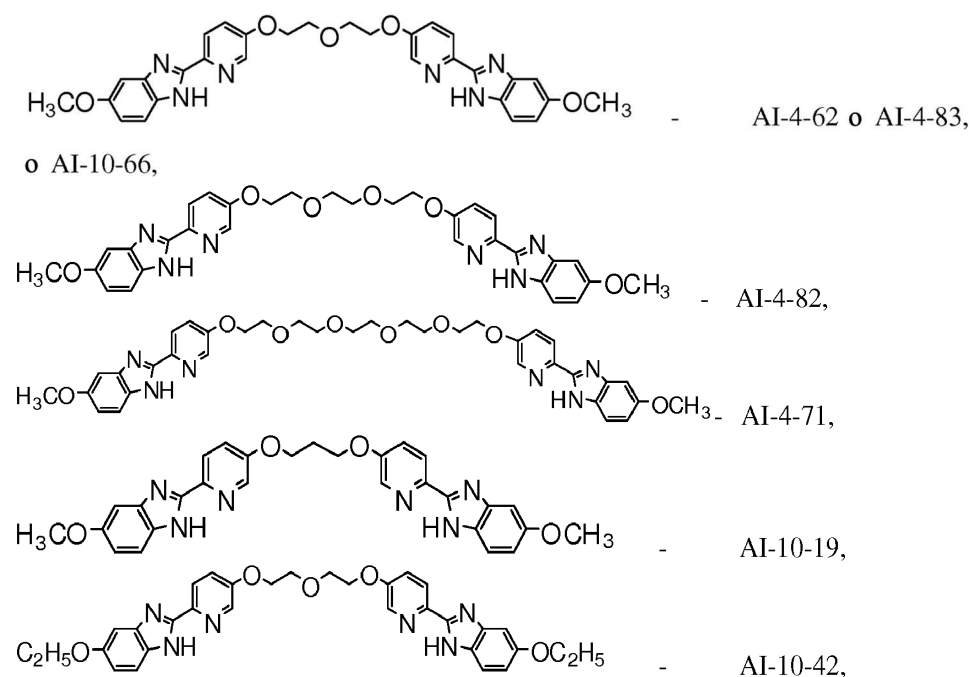


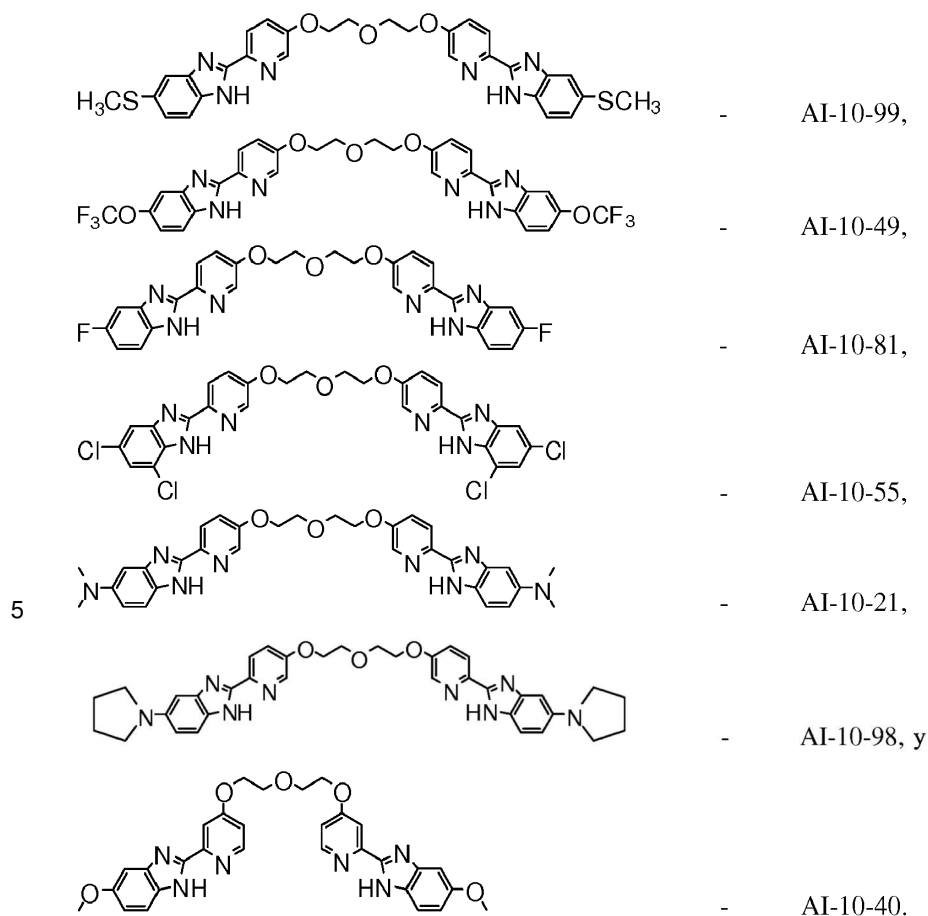




Los monómeros identificados anteriormente incluyen monómeros conocidos, así como nuevos monómeros descritos en la presente memoria. Los nuevos monómeros incluyen: AI-4-70 (LD-2-21), LD-1-138, AI-10-35, AI-10-37, AI-10-47, LD-1-33, AI-4-43, LD-1-39, AI-10-51, AI-4-49, AI-4-48, AI-10-83, AI-10-82, AI-10-3, AI-10-70, AI-10-97, AI-10-96, AI-4-61 (AI-10-52), AI-10-101, AI-10-11, AI-10-87, AI-10-53, AI-10-69, AI-10-63, AI-10-65, AI-10-64, LD-2-101, LD-2-91, AI-4-55, LD-2-99, LD-1-75, AI-4-53, AI-4-55, LD-1-73, AI-4-44 y AI-4-45.

Los compuestos diméricos útiles de la invención incluyen, entre otros, los siguientes compuestos:





La presente descripción da a conocer composiciones y métodos útiles para fabricar compuestos, como se describe en los ejemplos, incluida la figura 6. El experto en la materia apreciará que se pueden realizar modificaciones del esquema para sintetizar un compuesto particular de interés.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática del producto proteico de inv(16), CBFβ-SMMHC.

Figura 2. Esquema de la síntesis utilizada para preparar AI-4-57 (NCI320656) (R=R'=R''=H).

Figura 3. Modo de unión para AI-4-57 en la estructura de CBFβ. Las bolas azules y rojas indican cambios de desplazamiento químico de NH en el CBFβ tras la unión. El tamaño de la bola es proporcional a la magnitud del cambio del desplazamiento químico.

Figura 4. Estructuras de dos compuestos activos (AI-4-57 y LD-1-29) y uno inactivo (BI-7). 4A. Inhibición del crecimiento de las células ME-1 medidas por el ensayo MTT para AI-4-57 y LD-1-29. 4B. Inhibición del crecimiento de las células Kasumi-1, Jurkat y RS4;11 con AI-4-57 medido por el ensayo con MTT. 4C. Porcentaje de células que son Anexina V/PI (-/-) (verde), Anexina V/PI (+/-) (gris) y Anexina V/PI (++) (negro) para LD-1-29 y BI-7.

Figura 5. Representación esquemática de la mejora de la unión lograda por medio de una interacción bivalente de CBFβ-SMMHC con el ligando frente a una interacción monovalente de CBFβ al ligando.

Figura 6. Arriba: vía de síntesis de los dímeros de inhibidores de tipo bencimidazol. Abajo: estructura de determinados inhibidores diméricos.

Figura 7. Inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de las células ME-1 por monómeros e inhibidores diméricos medidos por el ensayo con MTT. SS = estaurosporina.

Figura 8. Efectos de AI-4-62 sobre el crecimiento de las células Kasumi-1, Jurkat y RS4; células 11.

En la **figura 9** se representan gráficamente los efectos de: 1) AI-4-83; 2) un monómero activo (LD-2-63); y 3) un monómero inactivo (AI-4-88) sobre la expresión de *CDKN1α*. Los efectos sobre la expresión de *CDKN1α* se midieron por RT-PCR. Control de DMSO; se usó AI-4-83 a 10,5 y 2,5 μM; se usó LD-2-63 a 80 y 40 μM; se usó AI-4-88 a 80 y 40 μM.

En la **figura 10**, que comprende las figuras 10A y 10B, se representan gráficamente los efectos de un inhibidor dimérico sobre la represión de inv(16) gracias a uso de un ensayo indicador con luciferasa. Arriba (10A): Efecto de AI-4-83 sobre la represión por inv(16) medido mediante un ensayo indicador con luciferasa. Se comprobó una respuesta a dosis de 0, 2,5, 5,0 y 10 μ M en MEF5E-4D3, MEF5E-4D3-1H2, MEF5E-4D3-4G6 y MEF5E-4D3-4G9. Abajo (10B): Efecto del siRNA de inv(16) sobre la represión por inv(16) medido con el mismo ensayo indicador con luciferasa-siRNA: barra izquierda; +siRNA: barra derecha; se comprobaron 5E-4D3, 5E-4D3-1H2, 5E-4D3-4G6 y 5E-4D3-4G9. La ordenada representa la actividad luciferasa relativa.

En la **figura 11** se representa gráficamente el efecto de AI-4-83 sobre la viabilidad de las células humanas. Las tres barras de la izquierda son el tratamiento con DMSO, AI-4-83 a 5 μ M e AI-4-83 a 10 μ M, y el efecto sobre la viabilidad de las CMN-MO de humano. Las tres barras de la derecha representan el tratamiento con DMSO, AI-4-83 a 5 μ M e AI-4-83 a 10 μ M, y los efectos sobre la viabilidad de las células de una muestra de paciente con inv(16).

En la **figura 12** se representa gráficamente el efecto de AI-4-83 a tres dosis diferentes (0,0, 1,0 y 2,0 μ M) sobre la apoptosis de células iniciadoras de la leucemia inv(16) de un modelo de ratón.

Descripción detallada

Definiciones

Al describir y reivindicar la invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones establecidas a continuación. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que suele conocer el experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria puede usarse en la práctica o para poner a prueba la presente invención, los métodos y materiales preferidos están descritos en la presente memoria. Tal y como se usa en la presente memoria, cada uno de los siguientes términos tiene el significado que se le asocia en este apartado. Los valores específicos y preferidos enumerados a continuación para radicales, sustituyentes y márgenes son solo ilustrativos; no excluyen otros valores definidos u otros valores dentro de márgenes definidos para los radicales y sustituyentes.

Los artículos "uno(a)" y "unos(as)" se usan en la presente memoria para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El término "aproximadamente", tal y como se usa en la presente memoria, significa aproximadamente, en la región de, groso modo, o alrededor de. Cuando el término "aproximadamente" se usa junto con un margen numérico, modifica ese margen al extender los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "aproximadamente" se usa en la presente memoria para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido con una variación del 10%. En un aspecto, el término "aproximadamente" significa el más o menos 20% del valor numérico del número con el que se está utilizando. Por lo tanto, aproximadamente el 50% significa que está en el margen del 45% al 55%. Los márgenes numéricos mencionados en la presente memoria mediante puntos finales incluyen todos los números y fracciones incluidos dentro de ese margen (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,90, 4 y 5). También debe saberse que todos los números y fracciones de los mismos se supone que están modificados por el término "aproximadamente".

Los términos "compuesto terapéuticamente activo adicional" o "agente terapéutico adicional", tal y como se usan en el contexto de la presente invención, se refieren al uso o administración de un compuesto para un uso terapéutico adicional para una lesión, enfermedad o trastorno particular que se está tratando. Tal compuesto, por ejemplo, podría incluir uno que se usa para tratar una enfermedad o trastorno no relacionado, o una enfermedad o trastorno que puede no responder al tratamiento primario para la lesión, enfermedad o trastorno que se está tratando.

Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "administración de" y/o "administrar" un compuesto deben entenderse que significan proporcionar un compuesto de la invención o un fármaco de un compuesto de la invención a un sujeto que necesita el tratamiento.

El término "adulto", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier sujeto no embrionario o no juvenil. Por ejemplo, el término "célula madre de tejido adiposo adulto" se refiere a una célula madre adiposa, distinta de la obtenida de un embrión o un sujeto juvenil.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "agonista" es una composición de sustancias que, cuando se administra a un mamífero tal como un humano, mejora o extiende una actividad biológica de interés. Tal efecto puede ser directo o indirecto.

Una enfermedad o trastorno se "alivia" si se reduce la gravedad de un síntoma de la enfermedad, afección o trastorno, o la frecuencia con la que un sujeto experimenta dicho síntoma, o ambas.

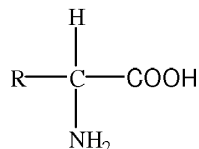
Tal y como se usa en la presente memoria, los aminoácidos están representados por el nombre completo de los mismos, por el código de tres letras correspondiente, o por el código de una letra correspondiente, como se indica en la siguiente tabla:

Nombre completo	Código de tres letras	Código de una letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Tirosina	Tyr	Y
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Triptófano	Trp	W

- 5 La expresión "aminoácido", tal y como se usa en la presente memoria, pretende incluir tanto aminoácidos naturales como sintéticos, y tanto los D como los L. "Aminoácido estándar" significa cualquiera de los veinte aminoácidos L estándares que se suelen encontrar en los péptidos naturales. Por "resto de aminoácido no estándar" se entiende cualquier aminoácido distinto de los aminoácidos estándares, independientemente de si se prepara por medios sintéticos o se deriva de una fuente natural. Tal y como se usa en la presente memoria, "aminoácido sintético" también
- 10 abarca los aminoácidos modificados químicamente, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, sales, derivados de aminoácidos (tales como amidas) y sustituciones. Los aminoácidos contenidos en los péptidos de la presente invención, y particularmente en los extremos carboxilo o amino, pueden modificarse por metilación, amidación, acetilación o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la semivida en circulación del péptido sin afectar negativamente a su actividad. Además, en los péptidos de la invención puede estar presente o ausente un
- 15 puente disulfuro.

El término "aminoácido" se usa indistintamente con "residuo de aminoácido", y puede referirse a un aminoácido libre y a un resto de aminoácido de un péptido. Será evidente por el contexto en el que se usa el término si se refiere a un aminoácido libre o a un resto de un péptido.

Los aminoácidos tienen la siguiente estructura general:



Los aminoácidos se pueden clasificar en siete grupos en función de la cadena lateral R: (1) cadenas laterales alifáticas, (2) cadenas laterales que contienen un grupo hidroxílico (OH), (3) cadenas laterales que contienen átomos de azufre, (4) cadenas laterales que contienen un grupo ácido o amida, (5) cadenas laterales que contienen un grupo básico, (6) cadenas laterales que contienen un anillo aromático y (7) prolina, un iminoácido en el que la cadena lateral está fusionada al grupo amino.

La nomenclatura utilizada para describir los compuestos peptídicos de la presente invención sigue la práctica convencional en la que el grupo amino se presenta a la izquierda y el grupo carboxilo a la derecha de cada resto de aminoácido. En las fórmulas que representan realizaciones específicas seleccionadas de la presente invención, los grupos de los extremos amino y carboxilo, aunque no se muestran específicamente, se entenderá que están en la forma que asumirían a valores de pH fisiológico, a menos que se especifique otra cosa.

El término aminoácido "básico" o "cargado positivamente", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a aminoácidos en los que los grupos R tienen una carga positiva neta a pH 7,0 e incluyen, pero sin limitarse a ellos, los aminoácidos estándares lisina, arginina e histidina.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "análogo" de un compuesto químico es un compuesto que, a modo de ejemplo, tiene una estructura que se parece a la de otro, pero no es necesariamente un isómero (por ejemplo, el 5-fluorouracilo es un análogo de la timina).

Un "antagonista" es una composición de sustancias que cuando se administra a un mamífero, tal como un ser humano, inhibe o impide una actividad biológica atribuible al nivel o presencia de un compuesto endógeno en el mamífero. Tal efecto puede ser directo o indirecto.

El término "agentes antimicrobianos", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier compuesto o composición o mezcla de los mismos de origen natural, sintético o semisintético, que es seguro para uso humano o animal como se pone en práctica en los métodos de esta invención, y es eficaz a la hora de destruir o inhibir sustancialmente el crecimiento de los microbios. "Antimicrobiano", tal y como se usa en la presente memoria, incluye agentes antibacterianos, antimicóticos y antivíricos.

"Antiproliferativo", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad que tiene un compuesto para impedir o inhibir la proliferación celular. Como tal, el compuesto puede actuar directamente sobre una célula o puede actuar indirectamente. Por ejemplo, en el contexto del cáncer, se puede inhibir la proliferación de una célula cancerosa al privarla del suministro de sangre. El término "antiproliferativo" no se refiere a ningún mecanismo particular por el cual se inhibe o impide la proliferación.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "agente antitumoral" se refiere a agentes conocidos en la técnica que han demostrado tener utilidad para tratar la enfermedad neoplásica. Por ejemplo, los antitumorales incluyen, pero sin limitarse a ellos, anticuerpos, toxinas, quimioterápicos, enzimas, citocinas, radionúclidos, agentes fotodinámicos e inhibidores de la angiogénesis. Las toxinas incluyen la cadena A de la ricina, exotoxinas mutantes de *Pseudomonas*, toxoide diftérico, estreptonigrina, boamicina, saporina, gelonina y proteína antivírica de hierba carmín. Los quimioterápicos incluyen 5-fluorouracilo (5-FU), daunorubicina, cisplatino, bleomicina, melfalán, taxol, tamoxifeno, mitomicina C y metotrexato, así como cualquiera de los compuestos descritos en la patente de los EE. UU. n.º 6,372,719 como quimioterápicos. Los radionúclidos incluyen radiometales. Los agentes fotodinámicos incluyen porfirinas y sus derivados.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "oligonucleótido antisentido" o ácido nucleico antisentido se refiere a un polímero de ácido nucleico, en donde al menos una porción del mismo es complementaria a un ácido nucleico que está presente en una célula normal o en una célula afectada. "Antisentido" se refiere particularmente a la secuencia de ácido nucleico de la cadena no codificante de una molécula de ADN bicatenaria que codifica una proteína, o a una secuencia que es sustancialmente homóloga a la cadena no codificante. Tal y como se define en la presente memoria, una secuencia antisentido es complementaria a la secuencia de una molécula de ADN bicatenaria que codifica una proteína. No es necesario que la secuencia antisentido sea complementaria únicamente a la porción codificante de la cadena codificante de la molécula de ADN. La secuencia antisentido puede ser complementaria a las secuencias reguladoras especificadas en la cadena codificante de una molécula de ADN que codifica una proteína, en donde dichas secuencias reguladoras controlan la expresión de las secuencias codificantes. Los oligonucleótidos antisentido de la invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, oligonucleótidos de tipo fosforotioato y otras modificaciones de oligonucleótidos.

El término "muestra biológica", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a las muestras obtenidas de un organismo vivo, que incluye piel, cabello, tejido, sangre, plasma, células, sudor y orina.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "fragmentos biológicamente activos" o "fragmento bioactivo" de los polipéptidos abarca las porciones naturales o sintéticas de la proteína completa que son capaces de unirse específicamente a su ligando natural o de realizar la función de la proteína.

Un "biomarcador" es un producto bioquímico específico en el cuerpo que tiene una característica molecular particular que lo hace útil para medir el progreso de la enfermedad o los efectos del tratamiento, o para medir un proceso de interés.

"Cáncer" o "neoplasia" se usan como sinónimos y se refieren a cualquiera de una serie de enfermedades que se caracterizan por una proliferación anómala y descontrolada de las células, la capacidad de las células afectadas para propagarse localmente o por el torrente circulatorio y el sistema linfático a otras partes del cuerpo (es decir, hacer metástasis), así como cualquiera de una serie de rasgos estructurales y/o moleculares característicos. Una "célula cancerosa" o "maligna" se entiende como una célula que tiene propiedades estructurales específicas, que carece de diferenciación y que es capaz de invadir y hacer metástasis. Ejemplos de cánceres son cáncer de mama, de pulmón, de cerebro, de hueso, de hígado, de riñón, de colon y de próstata. (véase DeVita, V. et al. (eds.), 2001, *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 6.ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pa).

"Asociado al cáncer" se refiere a la relación de un ácido nucleico y su expresión, o la falta de ella, o una proteína y su nivel o actividad, o la falta de ella, con el inicio de la neoplasia en una célula del sujeto. Por ejemplo, el cáncer puede estar asociado a la expresión de un gen particular que no se expresa, o que se expresa en poca cantidad, en una célula sana normal. Por el contrario, un gen asociado al cáncer puede ser uno que no se expresa en una célula maligna (o en una célula que sufre una transformación), o se expresa en menor cantidad en la célula maligna que en una célula sana normal.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "molécula portadora" se refiere a cualquier molécula que está químicamente conjugada con el antígeno de interés que permite una respuesta inmunitaria que da como resultado anticuerpos específicos contra el antígeno nativo.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "químicamente conjugado" o "que está conjugado químicamente" se refiere a unir el antígeno a la molécula portadora. Esta unión puede ocurrir a nivel genético gracias a la tecnología recombinante, en donde se puede producir una proteína híbrida que contiene las secuencias de aminoácidos, o porciones de las mismas, tanto del antígeno como de la molécula portadora. Esta proteína híbrida es producida por una secuencia de oligonucleótidos que codifica tanto el antígeno como la molécula portadora, o porciones de la misma. Esta unión también incluye enlaces covalentes creados entre el antígeno y la proteína portadora mediante el uso de otras reacciones químicas, tales como, pero sin limitarse a ellas, reacciones con glutaraldehído. Los enlaces covalentes también se pueden crear gracias a una tercera molécula que hace de puente entre el antígeno y la molécula portadora. Estos entrecruzadores son capaces de reaccionar con grupos, tales como, pero sin limitarse a ellos, aminas primarias, sulfhidrilos, carbonilos, glúcidos o ácidos carboxílicos, del antígeno y de la molécula portadora. La conjugación química también incluye un enlace no covalente entre el antígeno y la molécula portadora.

El término "secuencia competitiva" se refiere a un péptido o a una modificación, fragmento, derivado u homólogo del mismo que compete con otro péptido por su sitio de unión afín.

"Complementario" se refiere al concepto amplio de complementariedad de secuencia entre regiones de dos cadenas de ácido nucleico o entre dos regiones de la misma cadena de ácido nucleico. Se sabe que un resto de adenina de una primera región de ácido nucleico es capaz de formar puentes de hidrógeno específicos ("emparejamiento de bases") con un resto de una segunda región de ácido nucleico que es antiparalela a la primera región si el resto es timina o uracilo. Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, para la secuencia "A-G-T", su complementaria es la secuencia "T-C-A".

De manera similar, se sabe que un resto de citosina de una primera cadena de ácido nucleico es capaz de emparejarse según la base con un resto de una segunda cadena de ácido nucleico que es antiparalela a la primera cadena si el resto es guanina. Una primera región de un ácido nucleico es complementaria a una segunda región del mismo o un ácido nucleico diferente si, cuando las dos regiones están dispuestas de forma antiparalela, al menos un resto de nucleótido de la primera región es capaz de emparejarse según la base con un resto de la segunda región. Preferiblemente, la primera región comprende una primera porción y la segunda región comprende una segunda porción, por lo que, cuando la primera y la segunda porción están dispuestas de manera antiparalela, al menos aproximadamente el 50%, y preferiblemente al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95% de los restos de nucleótidos de la primera porción son capaces de emparejarse según la base con restos de nucleótidos en la segunda porción. Más preferiblemente, todos los restos de nucleótidos de la primera porción son capaces de emparejarse según la base con restos de nucleótidos en la segunda porción.

El término "complejo", tal y como se usa en la presente memoria en referencia a las proteínas, se refiere a la unión o interacción de dos o más proteínas. La formación o interacción de complejos puede incluir cosas tales como la unión, los cambios en la estructura terciaria y la modificación de una proteína por otra, tal como la fosforilación.

5 Un "compuesto", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de sustancia o agente que se suele considerar un fármaco, o un candidato para su uso como fármaco, así como combinaciones y mezclas de los anteriores.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "sustitución conservadora del aminoácido" se define en la presente memoria como un cambio de aminoácido dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

I. Restos pequeños alifáticos, apolares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

10 II. Restos polares con carga negativa y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln;

III. Restos polares con carga positiva: His, Arg, Lys;

IV. Restos grandes, alifáticos, apolares: Met, Leu, Ile, Val, Cys

V. Restos grandes aromáticos: Phe, Tyr, Trp

15 Una célula, tejido, muestra o sujeto de "control" es una célula, tejido, muestra o sujeto del mismo tipo que una célula, tejido, muestra o sujeto problema. El control puede, por ejemplo, examinarse con precisión o casi al mismo tiempo que se examina la célula, tejido, muestra o sujeto problema. El control también puede, por ejemplo, examinarse en un momento alejado del momento en el que se examina la célula, tejido, muestra o sujeto problema, y los resultados del examen del control pueden grabarse para que los resultados grabados puedan compararse con los resultados obtenidos mediante la evaluación de una célula, tejido, muestra o sujeto problema. El control también puede obtenerse de otra fuente o una fuente similar que no sea el grupo problema o un sujeto problema, en donde la muestra problema se obtiene de un sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno para el cual se realiza la prueba.

Una célula, tejido, muestra o sujeto "problema" es uno que está siendo evaluado o tratado.

25 El término "cáncer", tal y como se usa en la presente memoria, se define como la proliferación de células cuyo rasgo único, la pérdida de los controles normales, da como resultado nuevas características tales como crecimiento desregulado, falta de diferenciación, invasión local de tejidos y metástasis. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, leucemia, carcinoma no microcítico y cáncer de pulmón.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, un "derivado" de un compuesto se refiere a un compuesto químico que puede producirse a partir de otro compuesto de estructura similar en una o varias etapas, como en la sustitución de H por un grupo alquilo, acilo o amino.

El uso de la palabra "detectar" y sus variantes gramaticales se refiere a la medición de la especie sin cuantificación, mientras que el uso de la palabra "determinar" o "medir" con sus variantes gramaticales se refiere a la medición de la especie con cuantificación. Los términos "detectar" e "identificar" se usan indistintamente en la presente memoria.

35 Tal y como se usa en la presente memoria, un "marcador detectable" o una "molécula indicadora" es un átomo o una molécula que permite la detección específica de un compuesto que comprende el marcador en presencia de compuestos similares sin un marcador. Los marcadores detectables o las moléculas indicadoras incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, determinantes antigénicos, enzimas, ácidos nucleicos disponibles para hibridación, cromóforos, fluoróforos, moléculas quimioluminiscentes, moléculas detectables electroquímicamente y moléculas que alteran la polarización fluorescente alterada o alteran la dispersión de luz.

40 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "diagnóstico" se refiere a la detección del cáncer o un riesgo o propensión a desarrollar cáncer, de los tipos de cáncer abarcados por la invención. En cualquier método de diagnóstico existen falsos positivos y falsos negativos. Ningún método de diagnóstico proporciona una precisión del 100%.

45 Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal en el que el sujeto no puede mantener la homeostasis, y en el que si la enfermedad no mejora, la salud del sujeto continúa deteriorándose. En cambio, un "trastorno" en un sujeto es un estado de salud en el que el animal puede mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del sujeto es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si no se trata, un trastorno no necesariamente provoca una disminución adicional en el estado de salud del sujeto.

50 Tal y como se usa en la presente memoria, una "cantidad eficaz" significa una cantidad suficiente para producir un efecto seleccionado, tal como aliviar los síntomas de una enfermedad o trastorno, preferiblemente en el tratamiento de una leucemia inv(16). En el contexto de la administración de compuestos en forma de una politerapia, tal como múltiples compuestos, la cantidad de cada compuesto, cuando se administra en politerapia con uno o varios compuestos más, puede ser diferente de cuando ese compuesto se administra solo. Por lo tanto, una cantidad eficaz de una combinación de compuestos se refiere colectivamente a la combinación como un todo, aunque las cantidades

reales de cada compuesto pueden variar. El término "más eficaz" significa que el efecto seleccionado se alivia en mayor medida por un tratamiento en relación con el segundo tratamiento con el que se está comparando.

"Que codifica" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como plantilla para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en los procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia del ARNm y que se suele proporcionar en listados de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o un ADNc, puede decirse que codifica la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

A menos que se especifique otra cosa, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

Un "potenciador" es un elemento regulador del ADN que puede aumentar la eficiencia de la transcripción, independientemente de la distancia u orientación del potenciador en relación con el sitio de inicio de la transcripción.

El término "epítipo", tal y como se usa en la presente memoria, se define como pequeños grupos químicos en la molécula de antígeno que pueden desencadenar y reaccionar con un anticuerpo. Un antígeno puede tener uno o varios epítipos. La mayoría de los antígenos tienen muchos epítipos; es decir, son multivalentes. En general, un epítipo tiene un tamaño de aproximadamente 5 aminoácidos o azúcares. El experto en la materia sabe que, en general, la estructura tridimensional global, y no la secuencia lineal específica de la molécula, es el criterio principal de especificidad antigénica.

Tal y como se usa en la presente memoria, una preparación "esencialmente pura" de una proteína o péptido particular es una preparación en la que al menos aproximadamente el 95%, y preferiblemente al menos aproximadamente el 99%, en peso, de la proteína o péptido en la preparación es la proteína o el péptido concretos.

Un "fragmento" o "segmento" es una porción de una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido, o una porción de una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un nucleótido. Los términos "fragmento" y "segmento" se usan indistintamente en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria, una molécula "funcional" es una molécula en una forma en la que exhibe una propiedad o actividad por la cual se caracteriza. Una enzima funcional, por ejemplo, es la que exhibe la actividad catalítica característica por la cual se caracteriza la enzima.

"Homólogo", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la similitud de secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptidos. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas, por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias del compuesto son homólogas, entonces las dos secuencias son homólogas al 50 %, si el 90% de las posiciones, por ejemplo, 9 de 10, son coincidentes u homólogas, las dos secuencias comparten el 90% de homología. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 3'ATTGCC5' y 3'TATGGC comparten el 50% de homología.

Tal y como se usa en la presente memoria, "homología" se usa como sinónimo de "identidad".

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se puede lograr gracias a un algoritmo matemático. Por ejemplo, un algoritmo matemático útil para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264-2268), modificado como en Karlin y Altschul (1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877). Este algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410), y están accesibles, por ejemplo, en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las búsquedas de nucleótidos con BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST (denominado "blastn" en el sitio web del NCBI), utilizando los siguientes parámetros: penalización por hueco = 5; penalización por extensión de hueco = 2; penalización por discordancia = 3; recompensa por concordancia = 1; valor esperado 10,0; y tamaño de palabra = 11 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico descrito en la presente memoria. Las búsquedas de proteínas con BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST (denominado "blastn" en el sitio web del NCBI) o con el programa "blastp" del NCBI, utilizando los siguientes parámetros: valor esperado 10,0, matriz de puntuación BLOSUM62, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula proteica descrita en la presente memoria. Para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul y col. (1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402) Como alternativa, se pueden usar PSI-Blast o PHI-Blast para realizar una búsqueda iterativa que detecta las relaciones distantes entre moléculas (Id.) y las relaciones entre moléculas que comparten un

patrón común. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, PSI-Blast y PHI-Blast, se pueden usar los parámetros predeterminados de los correspondientes programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar mediante técnicas similares a las descritas anteriormente, permitiendo o no huecos. Al calcular el porcentaje de identidad, lo normal es que se cuentan las coincidencias exactas.

El término "inhibir", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad que tiene un compuesto de la invención para reducir o impedir una función descrita, tal como la proliferación celular, el crecimiento tumoral o la angiogénesis. Preferiblemente, la inhibición es al menos del 10%, más preferiblemente al menos del 25%, incluso más preferiblemente al menos del 50%, y lo más preferiblemente, la función está inhibida al menos al 75%.

Tal y como se usa en la presente memoria, "inyectar o aplicar" incluye la administración de un compuesto de la invención por cualquier número de vías y medios que incluyen, pero sin limitarse a ellos, por vía tópica, oral, yugal, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, vaginal, oftálmica, pulmonar o rectal.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "material de instrucción" incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad del péptido de la invención en el kit para efectuar el alivio de las diversas enfermedades o trastornos mencionados en la presente memoria. Opcionalmente, o como alternativa, el material de instrucción puede describir uno o varios métodos para aliviar las enfermedades o trastornos en una célula o un tejido de un mamífero. El material de instrucción del kit de la invención puede, por ejemplo, adjuntarse a un envase que contiene el compuesto identificado de la invención o enviarse junto con un envase que contiene el compuesto identificado. Como alternativa, el material de instrucción se puede enviar por separado del envase con la intención de que el material de instrucción y el compuesto sean utilizados de manera cooperativa por el receptor.

Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que se ha separado de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que normalmente están adyacentes al fragmento, por ejemplo, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que se encuentra de forma natural. El término también se aplica a los ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente de otros componentes que acompañan de manera natural al ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN o proteínas, que lo acompañan de manera natural en la célula. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que está incorporado en un vector, en un plásmido o virus que se replica de forma autónoma, o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula independiente (por ejemplo, como un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido por PCR o por digestión con enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia de polipéptido adicional.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "ligando" es un compuesto que se une específicamente a un compuesto diana. Un ligando (por ejemplo, un anticuerpo) "se une específicamente a" o "es específicamente inmunorreactivo con" un compuesto cuando el ligando funciona en una reacción de unión que es determinante de la presencia del compuesto en una muestra de compuestos heterogéneos. Por lo tanto, en las condiciones de ensayo designadas (por ejemplo, inmunoensayo), el ligando se une preferentemente a un compuesto particular y no se une de manera significativa a otros compuestos presentes en la muestra. Por ejemplo, un anticuerpo se une específicamente en las condiciones de inmunoensayo a un antígeno que lleva un epítipo contra el cual se generó el anticuerpo. Se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con un antígeno particular. Por ejemplo, los inmunoensayos de tipo ELISA en fase sólida se usan por norma para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con un antígeno. Véase Harlow y Lane, 1988, *Antibodies*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de los formatos y condiciones del inmunoensayo que pueden usarse para determinar la inmunorreactividad específica.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "enlace" se refiere a una conexión entre dos grupos. La conexión puede ser covalente o no covalente, que incluye, entre otros, enlaces iónicos, puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas/hidrófilas.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "conector" se refiere a una molécula que une otras dos moléculas de forma covalente o no covalente, por ejemplo, a través de enlaces iónicos o de puentes de hidrógeno o de interacciones de van der Waals.

La "expresión anómala" de un gen significa la expresión de un gen en una célula de un paciente afectado por una enfermedad o trastorno, en donde el nivel de expresión (incluida la ausencia de expresión), la porción del gen expresado o el momento de la expresión del gen con respecto al ciclo celular difiere de la expresión del mismo gen en una célula de un paciente que no está afectado por la enfermedad o trastorno. Se entiende que la expresión anómala puede provocar o contribuir a la enfermedad o trastorno, ser un síntoma de la enfermedad o trastorno, o ambos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico" abarca ARN, así como ADN y ADNc monocatenarios y bicatenarios. Además, los términos "ácido nucleico", "ADN", "ARN" y términos similares también

incluyen análogos de ácido nucleico, es decir, análogos que tienen un esqueleto de fosfodiéster diferente. Por ejemplo, los denominados "ácidos peptidonucleicos", que son conocidos en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en el esqueleto, se consideran dentro del alcance de la presente invención. Por "ácido nucleico" se entiende cualquier ácido nucleico, ya sea compuesto de desoxirribonucleósidos o ribonucleósidos, y ya sea compuesto por enlaces fosfodiéster o enlaces modificados, tales como enlaces fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato puenteado, metilfosfonato puenteado, fosforamidato puenteado, fosforamidato puenteado, metilfosfonato puenteado, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato puenteado o sulfona, y combinaciones de tales enlaces. El término ácido nucleico también incluye específicamente ácidos nucleicos compuestos de bases distintas de las cinco bases biológicas (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo). La notación convencional se usa en la presente memoria para describir secuencias de polinucleótidos: el extremo izquierdo de una secuencia polinucleotídica monocatenaria es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de una secuencia polinucleotídica bicatenaria se denomina sentido 5'. La dirección de adición de los nucleótidos de 5' a 3' en los ARN transcritos nacieses se denomina sentido de la transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se denomina "cadena codificante"; las secuencias en la cadena de ADN que se ubican en 5' con respecto a un punto de referencia en el ADN se denominan "secuencias precedentes o por delante"; las secuencias en la cadena de ADN que están en 3' con respecto a un punto de referencia en el ADN se denominan "secuencias posteriores o por detrás".

El término "construcción de ácido nucleico", tal y como se usa en la presente memoria, abarca las secuencias de ADN y ARN que codifican el gen concreto o el fragmento del gen deseado, ya sea obtenido por métodos genómicos o sintéticos.

A menos que se especifique otra cosa, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

El término "oligonucleótido" se refiere típicamente a polinucleótidos cortos, por lo general de menos de aproximadamente 50 nucleótidos. Se ha de saber que cuando una secuencia de nucleótidos está representada por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que la "U" reemplaza la "T".

"Unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes están configurados para realizar su función habitual. Por lo tanto, las secuencias de control o los promotores unidos operativamente a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Al describir dos polinucleótidos como "unidos operativamente" se entiende que un resto de ácido nucleico monocatenario o bicatenario comprende los dos polinucleótidos dispuestos dentro del resto de ácido nucleico de tal manera que al menos uno de los dos polinucleótidos es capaz de ejercer un efecto fisiológico por el cual se caracteriza sobre el otro. A modo de ejemplo, un promotor unido operativamente a la región codificante de un gen es capaz de promover la transcripción de la región codificante.

Tal y como se usa en la presente memoria, "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la ruptura física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la abertura en el tejido. Por lo tanto, la administración parenteral incluye, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica mediante la inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido, y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluya, pero sin limitación, técnicas de inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal y de infusión dialítica renal.

"Mejora de la penetración" y "potenciadores de la penetración", tal y como se usan en la presente memoria, se refieren al proceso y a los materiales añadidos que provocan un aumento de la permeabilidad de la piel a un agente farmacológicamente activo que atraviesa la piel de manera deficiente, es decir, para aumentar la velocidad a la que el fármaco atraviesa la piel y entra en el torrente circulatorio. "Potenciador de permeación" se usa indistintamente con "potenciador de la penetración".

El término "composición farmacéutica" significará una composición que comprende al menos un ingrediente activo, por lo que la composición se puede usar en investigación para un resultado específico y eficaz en un mamífero (por ejemplo, sin limitación, un humano). Los expertos en la materia conocerán y apreciarán las técnicas apropiadas para determinar si un ingrediente activo tiene un resultado eficaz deseado basado en las necesidades del experto.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándares, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, y varios tipos de humectantes. El término también abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de los EE. UU. o enumerados en la Farmacopea de los EE. UU. para su uso en los animales, incluidos los humanos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término éster o sal "fisiológicamente aceptable" significa una forma de éster o de sal del ingrediente activo que es compatible con cualquier otro ingrediente de la composición farmacéutica, que no es perjudicial para el sujeto al que se administrará la composición.

"Pluralidad" significa al menos dos.

- 5 Por "presensibilización" se entiende la administración previa de al menos un estimulador innato del sistema inmunitario antes de la exposición a un agente patógeno. Esto a veces se denomina inducción de la tolerancia.

El término "prevenir", tal y como se usa en la presente memoria, significa evitar que algo suceda o tomar medidas anticipadas contra algo que es posible o probable que ocurra. En el contexto de la medicina, "prevención" suele referirse a la acción tomada para disminuir la posibilidad de contraer una enfermedad o afección.

- 10 Un tratamiento "preventivo" o "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos, o exhibe solo signos tempranos, de una enfermedad o trastorno. Se administra un tratamiento profiláctico o preventivo con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar la patología asociada al desarrollo de la enfermedad o trastorno.

- 15 Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no exhibe signos de una enfermedad o lesión o exhibe solo signos tempranos de la enfermedad o lesión con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar la patología asociada a la enfermedad o lesión.

- 20 El término "vía reguladora de la proteína", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere tanto a la vía reguladora de las etapas previas que regulan una proteína, como a los acontecimientos posteriores que regulan esa proteína. Dicha regulación incluye, pero no se limita a, transcripción, traducción, cantidad, actividad, modificación postraducciona y función de la proteína de interés, así como los acontecimientos posteriores que regulan la proteína. Los términos "vía de la proteína" y "vía reguladora de la proteína" se usan indistintamente en la presente memoria.

- 25 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que se necesita para la expresión de un producto génico operativamente unido a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia del promotor mínimo y en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se necesitan para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que exprese el producto génico de una manera específica de tejido.

Un promotor "constitutivo" es un promotor que impulsa la expresión de un gen al que está operativamente unido, de manera constante en una célula. A modo de ejemplo, los promotores que impulsan la expresión de genes de mantenimiento celular se consideran promotores constitutivos.

- 30 Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente unida a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula viva sustancialmente solo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.

- 35 Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente unida a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula viva sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido que corresponde al promotor.

- 40 Tal y como se usa en la presente memoria, "grupo protector" con respecto a un grupo amino terminal se refiere a un grupo amino terminal de un péptido, en donde el grupo amino terminal está acoplado a cualquiera de los diversos grupos protectores aminoterminales empleados tradicionalmente en la síntesis de péptidos. Tales grupos protectores incluyen, por ejemplo, grupos protectores de acilo, tales como formilo, acetilo, benzoilo, trifluoroacetilo, succinilo y metoxisuccinilo; grupos aromáticos protectores de uretano tales como benciloxicarbonilo; y grupos alifáticos protectores de uretano, por ejemplo, *tert*-butoxicarbonilo o adamantiloxicarbonilo. Véase Gross y Mienhofer, eds., *The Peptides*, vol. 3, págs. 3-88 (Academic Press, Nueva York, 1981) para los grupos protectores adecuados.

- 45 Tal y como se usa en la presente memoria, "grupo protector" con respecto a un grupo carboxilo terminal se refiere a un grupo carboxilo terminal de un péptido, en donde el grupo carboxilo terminal está acoplado a cualquiera de una serie de grupos protectores carboxiterminales. Dichos grupos protectores incluyen, por ejemplo, *tert*-butilo, bencilo u otros grupos aceptables unidos al grupo carboxilo terminal a través de un enlace éster o éter.

- 50 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "purificado" y términos similares se refieren a un enriquecimiento de una molécula o compuesto en relación con otros componentes normalmente asociados a la molécula o compuesto en un entorno nativo. El término "purificado" no indica necesariamente que se haya logrado la pureza completa de la molécula particular durante el proceso. Un compuesto "altamente purificado" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un compuesto que tiene una pureza mayor del 90%.

El término "regular" se refiere a estimular o inhibir una función o actividad de interés.

"Polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no están unidas entre sí de forma natural. Se puede incluir un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado en un vector idóneo, y el vector se puede usar para transformar una célula hospedadora idónea.

5 Un polinucleótido recombinante también puede cumplir una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión al ribosoma, etc.).

Una célula hospedadora que comprende un polinucleótido recombinante se denomina "célula hospedadora recombinante". Un gen que se expresa en una célula hospedadora recombinante en la que el gen comprende un polinucleótido recombinante produce un "polipéptido recombinante".

Un "polipéptido recombinante" es uno que se produce tras la expresión de un polinucleótido recombinante.

10 Por "ARN pequeños interferentes (siRNA)" se entiende, entre otras cosas, una molécula de dsRNA aislada compuesta de una cadena sentido y una cadena antisentido. En un aspecto, tiene más de 10 nucleótidos de longitud. El siRNA también se refiere a un único transcrito que tiene tanto las secuencias sentido como las secuencias antisentido complementarias del gen deseado, por ejemplo, una horquilla. El siRNA incluye además cualquier forma de dsRNA (productos escindidos proteolíticamente de dsRNA más grande, ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente
15 puro, ARN sintético, ARN producido de forma recombinante), así como ARN alterado que difiere del ARN que se produce de forma natural por la adición, eliminación, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "soporte sólido" se refiere a un sustrato insoluble en el solvente que es capaz de formar enlaces (preferiblemente enlaces covalentes) con diversos compuestos. El soporte puede ser de naturaleza biológica, tal como, sin limitación, una célula o partícula de bacteriófago, o sintético, tal como, sin limitación, un derivado de acrilamida, agarosa, celulosa, nilón, sílice o partículas magnéticas.

25 El término "estándar", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a algo usado para comparación. Por ejemplo, un estándar puede ser un agente o compuesto estándar conocido que se administra o añade a una muestra de control y se usa para comparar los resultados al medir dicho compuesto en una muestra problema. En un aspecto, el compuesto estándar se añade o se prepara en una cantidad o concentración que es equivalente a un valor normal para ese compuesto en un sujeto normal. Estándar también puede referirse a un "estándar interno", tal como un agente o compuesto que se añade en cantidades conocidas a una muestra y es útil para determinar cosas tales como tasas de purificación o recuperación cuando una muestra se procesa o se somete a procedimientos de purificación o extracción antes de medir un marcador de interés.

Un "sujeto" de diagnóstico o tratamiento es un mamífero, incluido un humano.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, un "sujeto que lo necesita" es un paciente, animal, mamífero o humano, que se beneficiará del método de esta invención.

35 El término "sustancialmente puro" describe un compuesto, por ejemplo, una proteína o polipéptido, que se ha separado de los componentes que lo acompañan de forma natural. Típicamente, un compuesto es sustancialmente puro cuando al menos el 10%, más preferiblemente al menos el 20%, más preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente al menos el 99% del material total (en volumen, en peso húmedo o seco, o en porcentaje molar o fracción molar) en una muestra es el compuesto de interés. La pureza se puede medir por cualquier método apropiado, por ejemplo, en el caso de los polipéptidos por cromatografía en columna, electroforesis en gel o análisis por HPLC. Un compuesto, por ejemplo, una proteína, también está sustancialmente purificada cuando está esencialmente libre
40 de los componentes que van asociados de forma natural o cuando está separada de los contaminantes nativos que lo acompañan en su estado natural.

45 El término "síntoma", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier fenómeno mórbido o desviación de lo normal en la estructura, función o sensación, que experimenta el paciente y que son indicativos de enfermedad. En cambio, un "signo" es una prueba objetiva de enfermedad. Por ejemplo, una nariz ensangrentada es un signo. Es evidente para el paciente, el médico, la enfermera y otros observadores.

50 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tratar" incluye la profilaxis del trastorno o afección específicos, o el alivio de los síntomas asociados a un trastorno o afección específico y/o prevenir o eliminar dichos síntomas. Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad, o exhibe solo signos tempranos de la enfermedad, con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada a la enfermedad.

Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que exhibe signos de enfermedad con el propósito de disminuir o eliminar esos signos.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto es la cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se administra el compuesto.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tratar" incluye la profilaxis de la enfermedad, trastorno o afección específicos, o el alivio de los síntomas asociados a una enfermedad, trastorno o afección específico y/o prevenir o eliminar dichos síntomas.

Definiciones químicas

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "halógeno" o "halo" incluye bromo, cloro, flúor y yodo.

El término "haloalquilo", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un radical alquilo que lleva al menos un sustituyente halógeno, por ejemplo, clorometilo, fluoroetilo o trifluorometilo y similares.

10 El término "alquilo(C₁-C_n)" en donde n es un entero, tal y como se usa en la presente memoria, representa un grupo alquilo ramificado o lineal que tiene de uno a la cantidad especificada de átomos de carbono. Típicamente, los grupos alquilo(C₁-C₆) incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *tert*-butilo, pentilo, hexilo y similares.

15 El término "alqueno(C₂-C_n)" en el que n es un entero, tal y como se usa en la presente memoria, representa un grupo ramificado o lineal olefinicamente insaturado que tiene de 2 a la cantidad especificada de átomos de carbono y al menos un doble enlace. Ejemplos de tales grupos incluyen, pero sin limitarse a ellos, 1-propenilo, 2-propenilo, 1,3-butadienilo, 1-butenilo, hexenilo, pentenilo y similares.

El término "alquino(C₂-C_n)" en donde n es un número entero, se refiere a un grupo ramificado o lineal insaturado que tiene de 2 al número especificado de átomos de carbono y al menos un triple enlace. Los ejemplos de tales grupos incluyen, pero sin limitarse a ellos, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo y similares.

20 El término "cicloalquilo(C₃-C_n)" en donde n = 8, representa ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "opcionalmente sustituido" se refiere de cero a cuatro sustituyentes, en donde los sustituyentes se seleccionan cada uno independientemente. Cada uno de los sustituyentes seleccionados independientemente puede ser igual o diferente que otros sustituyentes.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "arilo" se refiere a un sistema de anillo carbocíclico mono- o bicíclico opcionalmente sustituido que tiene uno o dos anillos aromáticos que incluyen, pero sin limitarse a ellos, fenilo, bencilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo y similares. "Arilo opcionalmente sustituido" incluye compuestos de tipo arilo que tienen de cero a cuatro sustituyentes, y "arilo sustituido" incluye compuestos de arilo que tienen uno o más sustituyentes. El término alquil(C₅-C₈)arilo se refiere a cualquier grupo arilo que está unido al resto original a través del grupo alquilo.

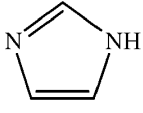
30 El término "grupo heterocíclico" se refiere a un sistema de anillo carbocíclico mono- o bicíclico opcionalmente sustituido que contiene de uno a tres heteroátomos, en el que los heteroátomos se seleccionan del grupo que consiste en oxígeno, azufre y nitrógeno.

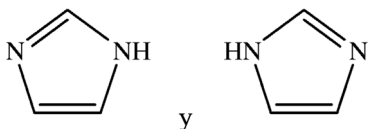
35 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo carbocíclico mono- o bicíclico opcionalmente sustituido que tiene uno o dos anillos aromáticos que contienen de uno a tres heteroátomos e incluye, pero sin limitarse a ellos, furilo, tienilo, piridilo y similares.

El término "bicíclico" representa un anillo de carbono bicíclico puenteado o fusionado estable, saturado o insaturado de 7 a 12 miembros. El anillo bicíclico puede estar unido a cualquier átomo de carbono que proporcione una estructura estable. El término incluye, pero sin limitarse a ellos, naftilo, dicitlohexilo, dicitlohexenilo y similares.

40 Los compuestos de la presente invención contienen uno o más centros asimétricos en la molécula. De acuerdo con la presente invención, debe entenderse que una estructura que no designa la estereoquímica abarca todos los diversos isómeros ópticos, así como sus mezclas racémicas.

Los compuestos de la presente invención pueden existir en formas tautómeras y la invención incluye tanto mezclas

como tautómeros individuales separados. Por ejemplo, la siguiente estructura:  se entiende que representa una mezcla de las estructuras:



El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que retienen la efectividad biológica y las propiedades de los compuestos de la presente invención y que no son indeseables ni desde el punto de vista biológico ni desde ningún otro. En muchos casos, los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales de ácido y/o de base en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

5 Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, solo a modo de ejemplo, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitarse a ellas, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, tales como alquilaminas, dialquilaminas, trialquilaminas, alquilaminas sustituidas, di(alquilo sustituido)aminas, tri(alquilo sustituido)aminas, alquenilaminas, dialquenilaminas, trialquenilaminas, alquenilaminas sustituidas, di(alquenilo sustituido)aminas, tri(alquenilo sustituido)aminas, cicloalquilaminas, di(cicloalquil)aminas, tri(cicloalquil)aminas, cicloalquilaminas sustituidas, cicloalquilaminas disustituidas, cicloalquilaminas trisustituidas, cicloalquenilaminas, di(cicloalquenil)aminas, tri(cicloalquenil)aminas, cicloalquenilaminas sustituidas, cicloalquenilamina disustituida, cicloalquenilaminas trisustituidas, arilaminas, diarilaminas, triarilaminas, heteroarilaminas, diheteroarilaminas, triheteroarilaminas, aminas heterocíclicas, aminas diheterocíclicas, aminas triheterocíclicas, di- y triaminas mixtas donde al menos dos de los sustituyentes en la amina son diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, heteroarilo, heterocíclico y similares. También se incluyen las aminas donde los dos o tres sustituyentes, junto con el nitrógeno amino, forman un grupo heterocíclico o heteroarilo. Los ejemplos de aminas idóneas incluyen, a modo de ejemplo solamente, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, tri(isopropil)amina, tri(n-propil)amina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, trometamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, N-alquilglucaminas, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, morfolina, N-etilpiperidina y similares. También debe saberse que otros derivados de ácido carboxílico serían útiles en la puesta en práctica de esta invención, por ejemplo, amidas de ácido carboxílico, que incluyen carboxamidas, alquilcarboxamidas inferiores, dialquilcarboxamidas y similares.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares.

Realizaciones

La presente descripción da a conocer composiciones, su uso y los métodos útiles para inhibir la proliferación de células de la leucemia inv(16) y para aumentar la apoptosis en las células de la leucemia inv(16). El método abarca la inhibición directa de las interacciones proteína-proteína.

Las composiciones incluyen compuestos conocidos y nuevos útiles para poner en práctica los métodos de la invención, así como métodos para preparar los compuestos. Las técnicas para preparar análogos, derivados y modificaciones de las estructuras genéricas de la invención se conocen en la técnica o se describen en la presente memoria. Algunos ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con los compuestos de la invención se debaten en la presente memoria o se conocen en la técnica. La presente descripción da a conocer además métodos para ensayar compuestos de la invención. Otros métodos para probar compuestos descubiertos con los métodos de la invención se describen en la presente memoria o se conocen en la técnica.

En los casos en que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales ácidas o básicas, el uso de los compuestos como sales puede ser apropiado. Ejemplos de sales aceptables son las sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato y α -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas idóneas, que incluyen sales de hidrocloreuro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

Las sales aceptables se pueden obtener mediante el uso de procedimientos estándares bien conocidos en la técnica, por ejemplo, al hacer reaccionar un compuesto suficientemente básico, tal como una amina, con un ácido idóneo que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden preparar sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.

En los casos en que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales de bases o ácidos no tóxicos estables, la administración de los compuestos como sales puede ser apropiada. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartarato, succinato, benzoato, ascorbato, -cetoglutarato y -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas idóneas, que incluyen sales de hidrocloreuro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse mediante el uso de los procedimientos estándares bien conocidos en la técnica, por ejemplo, al hacer reaccionar un compuesto suficientemente básico, tal como una amina, con un ácido idóneo que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden preparar sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.

Los compuestos de las fórmulas de la invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un hospedador mamífero, tal como un paciente humano en una variedad de formas adaptadas a la vía de administración elegida, a saber, oral o parenteral, por las vías intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

Por lo tanto, los presentes compuestos pueden administrarse sistémicamente, por ejemplo, por vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Pueden estar encerrados en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, pueden comprimirse en comprimidos o pueden incorporarse directamente con los alimentos de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos para chupar, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, comprimidos desleíbles y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0,1% del compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variar y puede estar por comodidad entre aproximadamente el 2% y aproximadamente el 60% del peso de una forma de dosis unitaria dada. La cantidad del compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, los trociscos, las píldoras, las cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: aglutinantes tal como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede agregar un edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo, o un aromatizante tal como menta, aceite de pirola o aroma de cereza. Cuando la forma de dosis unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Otros materiales diferentes pueden estar presentes como recubrimientos o si no para modificar la forma física de la forma de dosis unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden estar recubiertos con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como edulcorante, metil- y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizante tal como el sabor a cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosis unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El compuesto activo también puede administrarse por vía intravenosa o intraperitoneal mediante infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o sus sales se pueden preparar en agua, opcionalmente mezcladas con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosis farmacéuticas idóneas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo que están adaptados para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infusibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, líquida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El excipiente o vehículo líquido puede ser un solvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de las partículas necesario en el caso de las dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser llevada a cabo por diversos agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tamponantes o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de la esterilización por filtración. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de el secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado presente en las soluciones filtradas previamente y estériles.

Para la administración tópica, los presentes compuestos pueden aplicarse en forma pura, a saber, cuando son líquidos. Sin embargo, suele ser deseable administrarlos en la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido.

- Los vehículos sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos, tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los vehículos líquidos útiles incluyen agua, alcoholes o glicoles, o mezclas de agua-alcohol/glicol, en los que los presentes compuestos pueden disolverse o dispersarse en cantidades eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Se pueden agregar adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse a partir de almohadillas absorbentes, usarse para impregnar vendajes y otros apósitos, o rociarse sobre el área afectada usando pulverizadores de tipo bomba o aerosol.
- Los espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados también pueden emplearse con vehículos líquidos para formar pastas para untar, geles, ungüentos, jabones y similares, para su aplicación directa en la piel del usuario.
- Los ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que se pueden usar para administrar los compuestos en la piel tienen las fórmulas de la invención conocidas en la técnica; por ejemplo, véase Jacquet et al. (patente de los EE. UU. n.º 4,608,392), Geria (patente de los EE. UU. n.º 4,992,478), Smith et al. (patente de los EE. UU. n.º 4,559,157) y Wortzman (patente de los EE. UU. n.º 4,820,508).
- Las dosis útiles de los compuestos de la fórmula I se pueden determinar comparando su actividad *in vitro* y la actividad *in vivo* en modelos animales. Los métodos para la extrapolación de las dosis efectivas en los ratones, y otros animales, a humanos son conocidos en la técnica; por ejemplo, véase la patente de los EE. UU. n.º 4,938,949.
- Por lo general, la concentración del(de los) compuesto(s) de una fórmula de la invención, en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente el 0,1 al 25% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,5 al 10% en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida, tal como un gel o un polvo, será de aproximadamente el 0,1 al 5% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,5 al 2,5% en peso.
- La cantidad del compuesto, o una sal activa o derivado del mismo, requerido para ser usado en el tratamiento variará no solo con la sal particular seleccionada, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección a tratar y la edad y estado del paciente, y será en última instancia a discreción del médico de cabecera u hospitalario.
- Sin embargo, en general, una dosis idónea estará en el margen de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 75 mg/kg de masa corporal por día, tal como de 3 a aproximadamente 50 mg por kilogramo de masa corporal del receptor por día, preferiblemente en el margen de 6 a 90 (mg/kg)/día, lo más preferiblemente en el margen de 15 a 60 (mg/kg)/día.
- El compuesto se administra ventajosamente en forma de dosis unitaria; por ejemplo, que contiene de 5 a 1000 mg, ventajosamente de 10 a 750 mg, lo más ventajosamente de 50 a 500 mg de ingrediente activo por forma de dosis unitaria.
- Idealmente, el ingrediente activo debería administrarse para alcanzar las concentraciones plasmáticas máximas del compuesto activo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 75 μM , preferiblemente de aproximadamente 1 a 50 μM , lo más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 μM . Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la inyección intravenosa de una solución del 0,05 al 5% del ingrediente activo, opcionalmente en solución salina, o administrada por vía oral como un bolo que contiene aproximadamente de 1 a 100 mg del ingrediente activo. Los niveles sanguíneos deseables se pueden mantener mediante infusión continua para proporcionar aproximadamente de 0,01 a 5,0 (mg/kg)/h o mediante infusiones intermitentes que contienen aproximadamente de 0,4 a 15 mg/kg del ingrediente o ingredientes activos.
- La dosis deseada puede presentarse ventajosamente en una dosis única o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. La subdosis en sí misma puede dividirse adicionalmente, por ejemplo, en una cantidad de administraciones independientes y con un espaciamiento holgado; tales como inyecciones múltiples o por aplicación directa o tópica.
- Tal y como se usa en la presente memoria, un "material de instrucción" incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de la composición de la invención para su pretendido uso. El material de instrucción del kit de la invención puede, por ejemplo, estar anexo a un envase que contiene la composición o enviarse junto con un envase que contiene la composición. Como alternativa, el material de instrucción puede enviarse por separado del contenedor con la intención de que el material de instrucción y la composición sean utilizados cooperativamente por el destinatario.
- La presente descripción también incluye un kit que comprende al menos un compuesto identificado en la invención y un material de instrucción que describe la administración del compuesto o una composición que comprende el compuesto para una célula o un sujeto. Esto debe interpretarse que incluye otras realizaciones de kits que son conocidos por los expertos en la técnica, tales como un kit que comprende un solvente (preferiblemente estéril) idóneo para disolver o suspender la composición de la invención antes de administrar el compuesto a una célula o un sujeto. Preferiblemente, el sujeto es un humano.

De acuerdo con la presente invención, tal como se describe anteriormente o como se debate en los ejemplos a continuación, se pueden emplear técnicas convencionales químicas, celulares, histoquímicas, bioquímicas, de biología molecular, de microbiología e *in vivo* que son conocidas por los expertos en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía.

- 5 Sin una descripción adicional, se cree que un experto en la técnica puede, utilizando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, fabricar y utilizar los compuestos de la presente invención. Por lo tanto, los ejemplos deben interpretarse que abarcan todas y cada una de las variaciones que se hacen evidentes como resultado de la enseñanza dada a conocer en la presente memoria.

Ejemplos

- 10 *Ensayo FRET.* Hemos desarrollado ensayos eficaces para controlar la inhibición de la unión de CBF β -SMMHC al dominio Runt (así como para la unión de CBF β al dominio Runt). Fusionamos el derivado de proteína fluorescente verde Cerulean con el extremo amino del dominio Runt y el derivado de la proteína fluorescente verde Venus con el extremo amino del CBF β -SMMHC (así como con CBF β (Gorczyński, Grembecka et al. 2007)). La relación de la intensidad de emisión a 525 nm y a 474 nm, medida después de la excitación a 433 nm, se utilizó como lectura en este ensayo. El margen dinámico para el ensayo FRET se determinó por la adición de un exceso de 30 veces de CBF β -SMMHC sin etiquetar (o CBF β en el caso de la unión de CBF β al dominio Runt) al ensayo y el cambio asociado en la relación FRET se definió como una inhibición del 100%. Hemos validado el ensayo del CBF β -SMMHC-dominio Runt al determinar la K_d para la unión mediante la dilución en serie que da como resultado un valor de K_d de 15 nM, en total concordancia con el valor de K_d de 6 nM obtenido a partir de las mediciones calorimétricas de la unión del dominio Runt intacto al CBF β -SMMHC intacto (Lukasik, Zhang et al. 2002).

- 15 *Ensayo TR-FRET.* Es esencial tener un análisis secundario para descartar falsos positivos que son resultado de la interferencia con los análisis primarios que realizamos. Con ese fin, también hemos desarrollado un ensayo TR-FRET (FRET resuelto en el tiempo) para estas interacciones. Debido a la detección resuelta en el tiempo, esta estrategia tiene la clara ventaja de ser sustancialmente menos sensible a la autofluorescencia de moléculas pequeñas y, por lo tanto, es bastante eficaz para identificar los falsos positivos derivados de tales efectos (Bazin, Preaudat et al. 2001; Imbert, Unterreiner et al. 2007). Estamos usando el dominio Runt etiquetado con His, un anticuerpo marcado con Tb contra la etiqueta de His (donante) y Venus-CBF β -SMMHC (aceptor) para el ensayo TR-FRET. La excitación se realiza a 337 nm (Tb) y la emisión se lee a 490 nm (Tb) y 520 nm (Venus-CBF β -SMMC). La unión de las dos proteínas da como resultado un aumento en la relación de emisión 520/490, mientras que la interrupción de esta interacción da como resultado una disminución en la relación de emisión 520/490. Debido a la larga vida útil de la fluorescencia de Tb, la adquisición de la señal de emisión puede retrasarse varios cientos de microsegundos después de la excitación, lo que da lugar a una disminución sustancial de la fluorescencia derivada de moléculas pequeñas. Esto eliminará gran parte de la interferencia fluorescente de las moléculas pequeñas, e identificará, así pues, los falsos positivos derivados de tales efectos de fluorescencia. El ensayo TR-FRET se validó al llevar a cabo el experimento de valoración con la proteína CBF β -SMMHC sin marcar que competía con Venus-CBF β -SMMHC por unirse al dominio Runt. Esto dio lugar a un valor de Cl_{50} de 200 nM, en consonancia con el valor obtenido por FRET (Cl_{50} = 47 nM; la diferencia se debe a la concentración de la proteína 3 veces mayor utilizada en TR-FRET para obtener un margen dinámico adecuado para el ensayo TR-FRET).

- 20 *Controles para la inhibición promiscua por formación de micelas o unión covalente.* Tal y como se muestra en Shoichet y colaboradores (Seidler, McGovern et al. 2003), una fuente importante de falsos positivos en cualquier cribado es la formación de micelas. Para probar esto, todos los compuestos activos se criban por FRET una segunda vez en presencia del detergente Triton (Feng y Shoichet 2006). Una pérdida sustancial de actividad en presencia del detergente es un distintivo de inhibición por formación de micelas y, por lo tanto, tales compuestos se identifican como falsos positivos. Además, también incubamos el compuesto con las proteínas y lo comprobamos mediante espectroscopía de masas para asegurarnos de que los impactos positivos no actúan por adición covalente a ninguna de las proteínas.

- 25 *Espectroscopía de RMN para la validación de los compuestos de partida.* La validación de la unión de un inhibidor de tipo molécula pequeña a su proteína diana es una etapa esencial en el desarrollo de inhibidores potentes. Esto se puede lograr con facilidad mediante espectroscopía de RMN o cristalografía de rayos X. En el caso de la cristalografía de rayos X, esto se logra mediante la cocrystalización de la proteína con el ligando y la determinación de la estructura. En el caso de la espectroscopía de RMN, también se puede determinar la estructura de un complejo compuesto-proteína. Además, las perturbaciones por desplazamiento químico del espectro de RMN de la proteína (típicamente 2D ^{15}N - 1H HSQC o ^{13}C - 1H HSQC) en presencia de compuestos puede confirmar la unión a la diana y la localización del sitio de unión en una proteína (Pellecchia, Sem et al. 2002; Salvatella y Giralto 2003). El último método es un método rápido y eficaz para confirmar la unión a la proteína y para determinar el sitio de unión cuando las muestras marcadas apropiadas están disponibles y se conocen las asignaciones de resonancia. Tales datos también se pueden usar para acoplar la molécula pequeña a la proteína. Debido a que la estructura del CBF β se ha resuelto por RMN (Huang, Peng et al. 1999), las asignaciones de resonancia están disponibles y hemos empleado esta estrategia como un cribado adicional para garantizar la validez de los inhibidores que estamos desarrollando y para determinar el sitio de unión (véase más abajo).

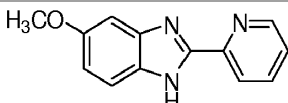
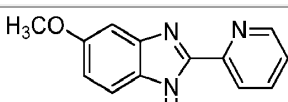
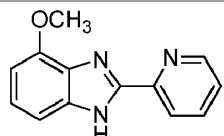
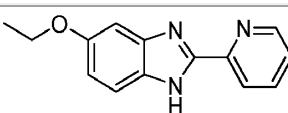
Desarrollo de inhibidores de aminotiazol: identificación del sitio alostérico en el CBFβ. Con el uso de una combinación de detección virtual, ensayos FRET y RMN, identificamos previamente una clase de inhibidores de tipo 2-aminotiazol de la unión del dominio Runt al CBFβ (Gorczyński, Grembecka et al. 2007). Estos se optimizaron para ser inhibidores a poco micromolar de la interacción entre el CBFβ y el dominio Runt. Posteriormente, se demostró que los compuestos más potentes inhiben el crecimiento de las líneas celulares de inv(16) e inducen cambios en la morfología que concordaban con una mayor diferenciación. Mediante el uso de la RMN, demostramos que estos compuestos no se unen a la interfase de heterodimerización del dominio Runt en el CBFβ, sino a un sitio alostérico al otro lado de la proteína. Sin embargo, también se observaron cambios sutiles de desplazamiento químico para los restos en la interfase de unión, lo que concuerda con una sutil alteración de la estructura o dinámica en la interfase que media la inhibición. Sorprendentemente, todos los esfuerzos de detección posteriores para identificar nuevos derivados de partida han dado como resultado la identificación solo de compuestos que se unen a este sitio alostérico, no a la interfase de heterodimerización, lo que sugiere que esta última es una diana difícil para la unión de moléculas pequeñas.

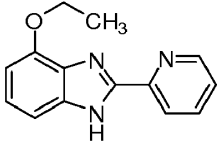
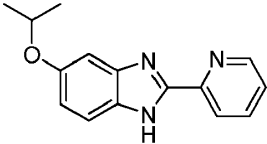
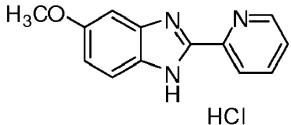
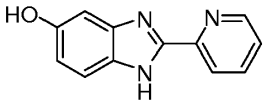
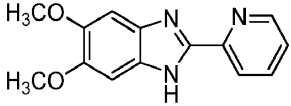
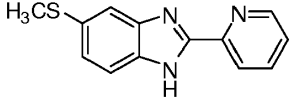
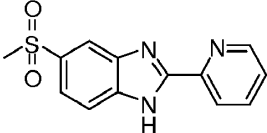
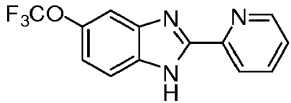
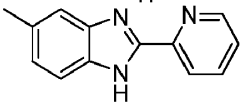
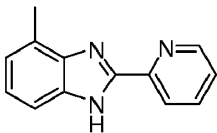
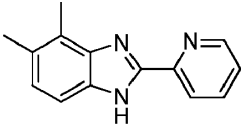
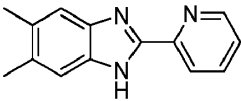
Si bien esta clase de compuestos proporcionó claramente un estudio de la viabilidad, hemos identificado en la presente memoria un compuesto de partida de tipo bencimidazol que ya es más potente para inhibir la unión de CBFβ-SMMHC al dominio Runt que el 2-aminotiazol mejor optimizado *in vitro* y muestra efectos superiores contra las líneas celulares de inv(16) (véase más abajo). La clase de bencimidazoles también muestra propiedades de solubilidad mejoradas en relación con los aminotiazoles. Por estas razones, actualmente estamos buscando un mayor desarrollo de la clase de bencimidazoles en lugar de los aminotiazoles.

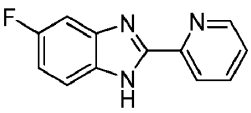
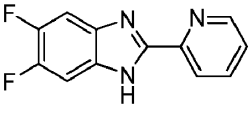
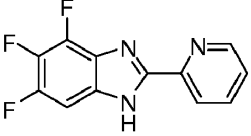
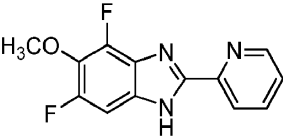
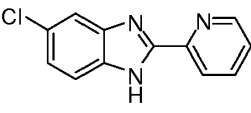
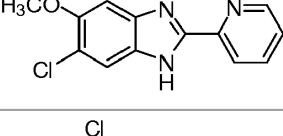
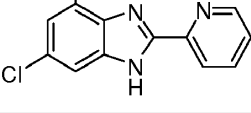
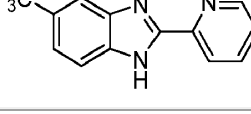
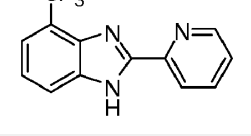
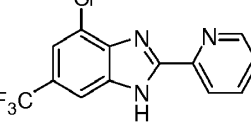
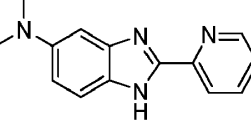
Cribado de la colección de compuestos del NCI. Utilizamos el ensayo FRET descrito anteriormente para cribar el NCI Diversity Set (1990 compuestos). Los resultados positivos de esta criba fueron verificados posteriormente por RMN mediante detección de las alteraciones por desplazamiento químico en los espectros de ¹⁵N-¹H HSQC, como se describió anteriormente. Esto dio como resultado la identificación de un compuesto de partida. Este compuesto, NCI 320656, mostró una IC_{50} de 16 μ M para la inhibición de la unión CBF-SMMHC/dominio Runt (véase la tabla 1 a continuación; AI-4-57 = NCI 320656). Esto es aproximadamente lo mismo, sin ninguna optimización, para la IC_{50} de aproximadamente 10 μ M que observamos los inhibidores optimizados de tipo 2-aminotiazol para la inhibición de la interacción de CBF-SMMHC/dominio Runt. Con la optimización, deberíamos ser capaces de crear inhibidores sustancialmente más potentes a partir de este compuesto de partida. Es importante destacar que los datos en el sitio web de NCI Developmental Therapeutics indican que este compuesto lo toleran los ratones a concentraciones de hasta 200 (mg/kg)/día por inyección i.p. Además, los datos para la inhibición de las 60 líneas celulares del NCI muestran que para el 79% de las líneas celulares, la GI_{50} es $\geq 100 \mu$ M, lo que indica una falta de citotoxicidad general.

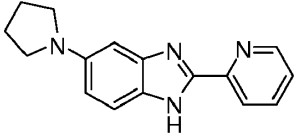
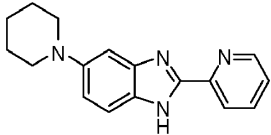
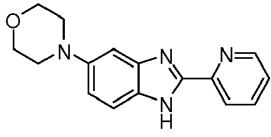
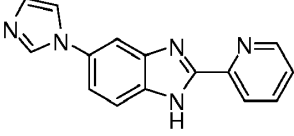
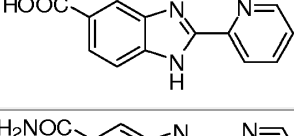
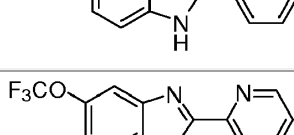
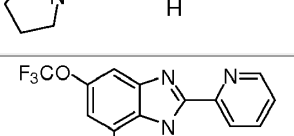
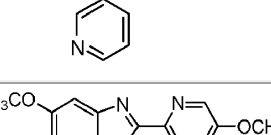
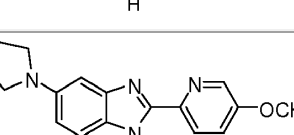
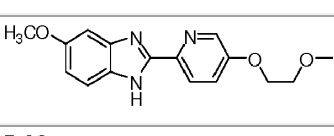
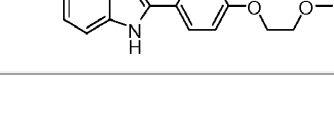
En la tabla 1 se resumen algunos de los bencimidazoles monoméricos utilizados en la presente memoria y da a conocer la estructura y la actividad biológica de los compuestos probados. Téngase en cuenta que algunos de los compuestos descritos en la presente memoria tienen más de un nombre y cada nombre se da a conocer en la presente memoria.

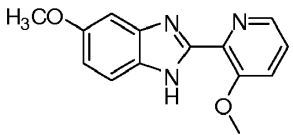
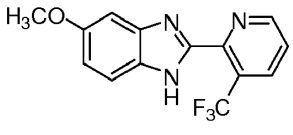
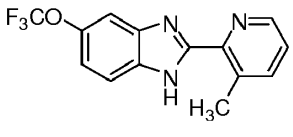
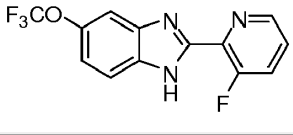
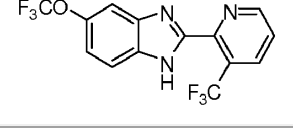
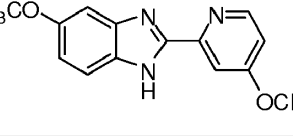
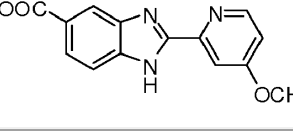
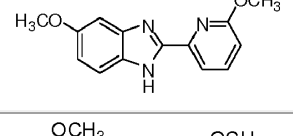
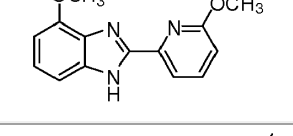
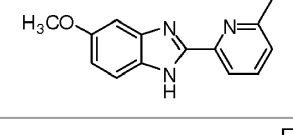
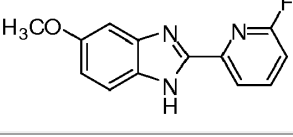
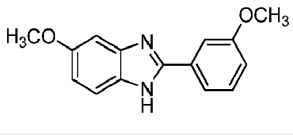
TABLA 1. Actividad de los inhibidores de tipo bencimidazol

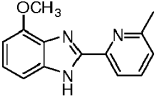
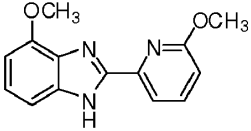
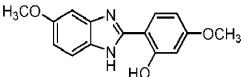
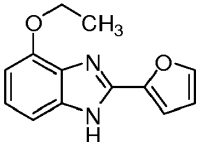
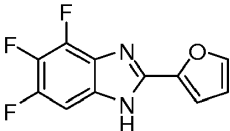
Compuesto	Estructura	RMN con CBFβ + compuesto G 112/K 98 a 250 μ M	IC_{50} FRET (μ M) (CBFβ- SMMHC: RD, 20 nM ambos)	Δ (%)
NCI-320656		CSP	16	85
		0,039/0,026 ppm		
AI-4-57 (o) LD- 1-11C		CSP	2,6	46
		0,039/0,026 ppm		
AI-4-52			5,5	39
LD-1-29 (o) AI- 10-54		CSP 0,026/sin cambio ppm	1,5	44

Compuesto	Estructura	RMN con CBF β + compuesto G 112/K 98 a 250 μ M	IC ₅₀ FRET (μ M) (CBF β - SMMHC: RD, 20 nM ambos)	Δ (%)
AI-4-42			4,2	38
AI-4-70 (o) LD-2-21		Sin CSP	1,4	40
LD-1-127	 HCl		2	53
AI-10-61		Sin CSP	2,5	33
LD-1-138			4,6	41
AI-10-35		CSP 0,037/0,027 ppm	1,8	47
AI-10-37			3,3	53
AI-10-47		Sin CSP (algo de precipitación)	1,0	43
LD-2-11			2,9	29
AI-4-46			5,3	35
LD-1-23		Sin CSP	4,3	56
		(algo de precipitación)		
LD-1-37			2	31

Compuesto	Estructura	RMN con CBF β + compuesto G 112/K 98 a 250 μ M	IC ₅₀ FRET (μ M) (CBF β - SMMHC: RD, 20 nM ambos)	Δ (%)
LD-1-31		Sin CSP	2,5	35
		(Fuerte precipitación)		
LD-1-33			2,5	26
AI-4-43			1,4	41
LD-1-39		Sin CSP	1,3	31
LD-2-79			2,3	42
AI-10-51			1,3	39
AI-4-49			0,7	49
LD-2-23			1,1	30
AI-4-47			Interferencia con el ensayo.	
AI-4-48			0,76	49
LD-2-63		CSP	Interferencia con el ensayo.	
		0,037/0,023 ppm		

Compuesto	Estructura	RMN con CBF β + compuesto G 112/K 98 a 250 μ M	IC ₅₀ FRET (μ M) (CBF β - SMMHC: RD, 20 nM ambos)	Δ (%)
AI-10-83		CSP grande 0,087/0,039 ppm L 97 = 0,034 ppm	Interferencia con el ensayo.	
AI-10-82		CSP	Interferencia con el ensayo.	
		0,032/0,016 ppm		
AI-10-3		Sin CSP	1,0	31
AI-10-88		Sin CSP	3,4	53
AI-10-57		Sin CSP	40	67
AI-10-70			NS	$\Delta_{500} = 61$
AI-10-97		CSP 0,012/0,006 ppm	Interferencia con el ensayo.	
AI-10-96		Sin CSP	2,0	31
AI-4-61 (o) AI-10-52		CSP	2,5	34
		0,015/0,013 ppm		
AI-10-101			Interferencia con el ensayo.	
AI-10-11			2,3	34
AI-10-87			2,3	37

Compuesto	Estructura	RMN con CBF β + compuesto G 112/K 98 a 250 μ M	IC ₅₀ FRET (μ M) (CBF β - SMMHC: RD, 20 nM ambos)	Δ (%)
AI-10-53		CSP	3,0	61
		0,028/0,02 ppm		
AI-10-69			NS	Δ_{167} = 18
AI-10-63			NS	Δ_{500} = 61
AI-10-65			22	53
AI-10-64			NS	Δ_{500} = 50
LD-2-101		Sin CSP	1,0	47
AI-10-77			2,0	21
LD-2-91			N/A	
AI-4-55			N/A	
LD-2-89			NS	Δ_{333} = 17
LD-2-99			N/A	
LD-1-75			N/A	

Compuesto	Estructura	RMN con CBF β + compuesto G 112/K 98 a 250 μ M	IC ₅₀ FRET (μ M) (CBF β - SMMHC: RD, 20 nM ambos)	Δ (%)
AI-4-53			N/A	
AI-4-55			N/A	
LD-1-73			NS	$\Delta_{110} = 30$
AI-4-44			N/A	
AI-4-45			N/A	

De los monómeros identificados anteriormente, los siguientes son nuevos y se describen en la presente memoria: AI-4-70 (LD-2-21), LD-1-138, AI-10-35, AI-10-37, AI-10-47, LD-1-33, AI-4-43, LD-1-39, AI-10-51, AI-4-49, AI-4-48, AI-10-83, AI-10-82, AI-10-3, AI-10-70, AI-10-97, AI-10-96, AI-4-61 (AI-10-52), AI-10-101, AI-10-11, AI-10-87, AI-10-53, AI-10-69, AI-10-63, AI-10-65, AI-10-64, LD-2-101, LD-2-91, AI-4-55, LD-2-99, LD-1-75, AI-4-53, AI-4-55, LD-1-73, AI-4-44 y AI-4-45.

Elaboración de la clase de bencimidazoles. El mejor compuesto de la clase de bencimidazoles que emerge de los esfuerzos de cribado descritos en la presente memoria es el NCI 320656, del NCI Diversity Set. Hemos sintetizado este compuesto (nombre interno: **AI-4-57**) mediante la vía de síntesis que se muestra en la figura 2, se confirmó su actividad mediante FRET y se confirmó la unión al CBF β mediante espectroscopía de RMN. Téngase en cuenta que la estructura que se muestra en la Fig. 2e 2 es un regioisómero (5-metoxi frente a 4-metoxi) de la estructura que figura en la página web del NCI Diversity Set, como lo demostramos mediante la síntesis de ambos isómeros y la comparación de los datos de RMN con los del compuesto proporcionado por el NCI, que el isómero 5-metoxi es el compuesto real en la colección. Mediante el uso de una vía de síntesis similar, se han preparado y analizado análogos para sondear las relaciones estructura-actividad (REA) y para valorar los sitios donde podemos introducir un conector para la formación de dímeros (véase más abajo). Todos los compuestos se caracterizan completamente por ¹H RMN, ¹³C RMN, espectroscopia de masas y análisis de combustión antes de las pruebas biológicas. En la tabla 1 se enumeran los datos de Cl₅₀ para varios compuestos activos de la invención.

Modelado de la unión del bencimidazol al CBF β . Como se ve para los inhibidores de tipo aminotiazol, los cambios de desplazamiento químico en la RMN tras la adición del compuesto al CBF β muestran claramente que el compuesto de la colección del NCI se une en el sitio alostérico que identificamos previamente. En función de la localización del sitio de unión a partir de datos de la RMN, el programa GLIDE (Friesner, Banks et al. 2004; Halgren, Murphy et al. 2004; Friesner, Murphy et al. 2006) se usó para acoplar el NCI320656 (**AI-4-57**) al CBF β . Esto dio como resultado dos posibles orientaciones para el compuesto en el sitio de unión. Para distinguir estas dos orientaciones posibles, se ha sintetizado un análogo con un grupo etilo en la posición 5 del sistema de anillo de piridina. Uno de los modelos de acoplamiento predice un choque estérico para este sustituyente, mientras que el otro no. La medición FRET de la actividad produce un valor de Cl₅₀ de 2 μ M, es decir, tiene una actividad similar al compuesto original, que es congruente con solo uno de los dos modelos (véase la figura 3). La disponibilidad de este modelo de acoplamiento permitirá diseñar sustituciones en el compuesto original y predecir su eficacia con el uso de GLIDE, lo que lo convierte en una estrategia más eficiente para optimizar esta clase de compuestos.

Efectos sobre las líneas celulares inv(16). Les hemos probado a varios de los compuestos que hemos sintetizado sus efectos sobre las células ME-1, una línea celular de leucemia que alberga la inv(16) (Yanagisawa, Horiuchi et al. 1991). Para estos estudios se han empleado dos compuestos activos (**AI-4-57** FRET Cl₅₀ = 1,3 μ M y **LD-1-29** FRET Cl₅₀ =

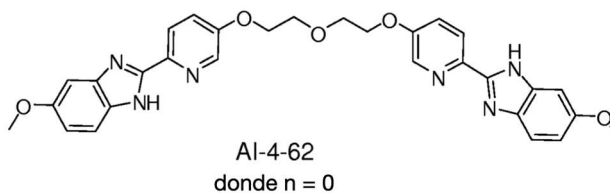
0,7 μM) y un compuesto inactivo (**BI-7** FRET $\text{Cl}_{50} \geq 250 \mu\text{M}$). Se han evaluado los efectos sobre el crecimiento mediante el uso de un ensayo de viabilidad con MTT (Mosmann 1983) para los 2 compuestos activos (véase la figura 4.A), que muestra una inhibición efectiva del crecimiento para estos 2 compuestos. El **AI-4-57** también se ha probado contra las líneas celulares de leucemia Kasumi-1, Jurkat y RS4;11 (figura 4.B). No se observó ningún efecto sobre el crecimiento para las líneas celulares Jurkat y RS4;11, líneas celulares, de leucemia independiente de CBF, mientras que hubo un efecto modesto en las células Kasumi-1, una línea celular de leucemia CBF (alberga la fusión AML1-ETO). También hemos examinado los efectos sobre la apoptosis mediante citometría de flujo para medir la positividad de la anexina V/PI (yoduro de propidio). La figura 4.C muestra un gráfico de barras de los efectos de 3 concentraciones diferentes de **LD-1-29** y una concentración de **BI-7** sobre los porcentajes de células que son anexina V/PI (-/-) (células no apoptóticas), anexina V/PI (+/-) (células apoptóticas tempranas) y anexina V/PI (+/+) (células apoptóticas tardías). Existe un claro aumento dependiente de la dosis sobre el porcentaje de células apoptóticas con **LD-1-29**, mientras que **BI-7** muestra poco o ningún efecto a la concentración de 40 μM donde **LD-1-29** muestra una apoptosis sustancial. La selectividad por las líneas celulares específicas y la correlación de la actividad en el ensayo FRET con efectos en las células inv(16) respaldan la hipótesis de que los compuestos están alcanzando la diana deseada.

Justificación del aumento de la especificidad mediante el uso de inhibidores diméricos. Numerosos estudios han demostrado que las células cancerosas son con frecuencia "adictas" o altamente dependientes de determinados oncogenes (Sharma y Settleman 2007; Weinstein y Joe 2008). Un claro ejemplo de esto se encuentra en la leucemia mieloide crónica (LMC), donde es esencial la proteína de fusión BCR-ABL que se encuentra en estas células. La inhibición de esta cinasa activada con el imatinib (Gleevec) ha demostrado ser extraordinariamente eficaz en el tratamiento de estos pacientes (Druker 2004; Lydon y Druker 2004). Del mismo modo, nuestra hipótesis es que la inhibición del CBF β -SMMHC es probable que sea eficaz para la leucemia inv(16). En la LMC, el imatinib inhibe la actividad de BCR-ABL, así como el resto de la ABL de tipo silvestre presente en las células, aunque las células de la leucemia se eliminan con eficacia debido a la adicción de estas células al BCR-ABL. Sobre la base de esta analogía, es plausible que los inhibidores de tipo molécula pequeña que se actúan selectivamente sobre el CBF β , con lo que afectan tanto al CBF β -SMMHC como al CBF β de tipo silvestre, sean eficaces y valgan la pena.

Sin embargo, un estudio reciente en el que la dosis del CBF β se redujo en presencia del CBF β -SMMHC en un modelo de ratón mostró una potenciación de la leucemiogénesis, lo que sugiere que la inhibición del CBF β y el CBF β -SMMHC podría no ser efectiva. Por lo tanto, también es importante desarrollar inhibidores que puedan inhibir selectivamente el CBF β -SMMHC con efectos mínimos sobre el CBF β . Para lograr esto, proponemos aprovechar la naturaleza oligomérica del CBF β -SMMHC y aplicar los principios de polivalencia (Mammen, Choi et al. 1998; Kiessling, Gestwicki et al. 2006) para lograr la selectividad deseada. De acuerdo con la bibliografía existente sobre la miosina, hemos demostrado que las formas truncadas del CBF β -SMMHC que carecen del extremo carboxilo forman dímeros en solución (Lukasik, Zhang et al. 2002). Para la proteína de longitud completa, estos dímeros se oligomerizan entonces para formar oligómeros de orden superior (Shigesada, van de Sluis et al. 2004). En cambio, el CBF β es monomérico en solución. Esta diferencia en la oligomerización proporciona un medio para lograr la inhibición selectiva del CBF β -SMMHC frente al CBF β .

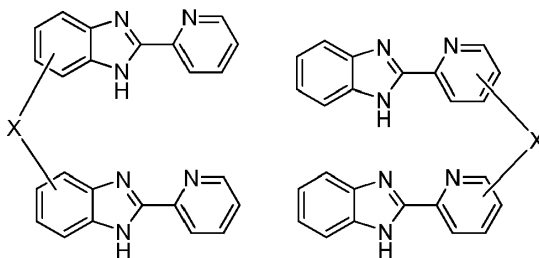
Tal y como se muestra en la figura 5, la constante de disociación para un compuesto monovalente que se une al CBF β monomérico es igual a $K_d(\text{monómero})$. Si creamos un homodímero de este compuesto, se unirá a la proteína del CBF β monomérico con una constante de disociación igual a $K_d(\text{monómero})/2$. Sin embargo, este mismo homodímero interactuará con dos sitios en la proteína dimérica CBF β -SMMHC y tendrá una $K_d(\text{dímero})$ igual a $(K_d(\text{monómero}))^2/C_{\text{ef}}$ donde C_{ef} es la concentración eficaz resultante de la unión de los dos sitios de unión en CBF β -SMMHC entre sí (Mulder, Auletta et al. 2004). Los análisis recientes de la dependencia de los valores de C_{ef} en las proteínas basándose en la longitud del péptido flexible que la interrumpe permiten estimar con exactitud los valores de C_{ef} (Goldenberg 2003). Hemos asignado las resonancias de RMN de una construcción CBF β -SMMHC y medimos el NOE heteronuclear para determinar la longitud de la región flexible entre el CBF β y la superhélice de miosina. Nuestro conocimiento de la longitud del conector entre el CBF β y la superhélice de miosina hace posible estimar la C_{ef} , lo que da lugar a un valor predicho de 6 a $40 \times 10^{-3} \text{ M}$ (existen dos modelos diferentes para los cálculos de la C_{ef} y la mayoría de los valores experimentales se encuentran entre estos dos modelos). Por lo tanto, un monómero con una K_d de 10 μM , cuando interactúa adecuadamente, producirá un inhibidor con una K_d prevista de tan solo 2,5 a 17 nM, con desprecio de las pérdidas entrópicas necesarias para la unión. Esto corresponde a una selectividad de aproximadamente 1000 veces para CBF β -SMMHC. Sin desear comprometerse con ninguna teoría en particular, se propone en la presente memoria que la creación de homodímeros de inhibidores de CBF β proporcionará un medio para lograr la selectividad por CBF β -SMMHC y, con ello, proporcionará un mecanismo para inhibir selectivamente la actividad de CBF β -SMMHC mientras se afecta mínimamente al CBF β .

Síntesis de compuestos diméricos. Estamos explorando la conexión de los inhibidores de tipo bencimidazol a través del anillo de piridina con fijación en las posiciones 3, 4 y 5 del anillo de piridina. Tal y como se muestra en la figura 6, hemos desarrollado una estrategia eficiente para generar compuestos enlazados por la posición 5. Se han incorporado una serie de conectores de tipo polietilenglicol de diferente longitud (7, 10, 16 átomos). Las pruebas con varias longitudes de conectores han demostrado que el compuesto con 7 átomos unidos es el más potente, por lo que los estudios posteriores se han centrado en este compuesto (denominado AI-4-62 o **AI-4-83** más abajo).



Efectos de los compuestos diméricos sobre las células ME-1 (una línea celular inv(16)). Al dímero con un conector de 7 átomos (**AI-4-62**) se le ha comprobado su efecto sobre el crecimiento de la línea celular ME-1 (véase la figura 7), una línea celular de leucemia con inv(16). Para demostrar la eficacia del dímero en relación con el inhibidor monomérico original, hemos comprobado ambos en las células ME-1. Sorprendentemente, el compuesto dimérico es sustancialmente (unas 15 veces) más potente que el monómero correspondiente, lo que indica una mejora sustancial de la eficacia, como predijimos. Estos datos y los resultados del ensayo *in vitro* proporcionan la validación para la estrategia del desarrollo de inhibidores diméricos para mejorar la especificidad y la eficacia.

Efectos de los compuestos diméricos en otras líneas celulares de leucemia. Para comprobar la especificidad de estos compuestos, hemos comprobado el efecto de **AI-4-62** sobre varias líneas celulares de leucemia que no tienen inv(16): Kasumi-1 (LMA con t(8;21)), Jurkat (LLA con citogenética compleja) y RS4;11 (LLA con t(4;11)). Tal y como se muestra en la figura 8, el **AI-4-62** tuvo poco o ningún efecto en estas líneas celulares a una concentración de 10 μ M, una concentración en la que el crecimiento de las células ME-1 está inhibido al 100%. Estos datos proporcionan una prueba sólida que apoya la especificidad de **AI-4-62**. A continuación se muestran dos ejemplos de fórmulas de compuestos diméricos, que se muestran aquí sin los posibles sustituyentes indicados en otra parte de la presente memoria.



Efectos del inhibidor dimérico sobre el nivel de expresión de p21 en las células ME-1. Los efectos del inhibidor dimérico **AI-4-83** sobre la expresión génica de CDKN1a se examinaron mediante el uso de RT-PCR. En la figura 9 se muestra un aumento sustancial dependiente de la dosis en la expresión del gen de CDKN1a con el tratamiento con **AI-4-83** que se correlaciona bien con los efectos inhibidores del crecimiento del compuesto. Esto proporciona datos que muestran un cambio en la expresión génica en una diana RUNX conocida que se ha demostrado que reduce su expresión mediante CBF β -SMMHC, con lo que se proporcionan datos que respaldan que el efecto del compuesto sea directo. Además, el efecto de **AI-4-83** es mucho más sustancial que el del compuesto monomérico, lo que respalda la mayor eficacia de los compuestos diméricos frente a los monoméricos.

Efectos del inhibidor dimérico sobre la represión de inv(16) con el uso de un ensayo indicador con la luciferasa. Se ha desarrollado un ensayo indicador con la luciferasa para comprobar los efectos de los inhibidores sobre la represión de inv(16). La expresión de la luciferasa está impulsada por múltiples copias de un sitio de unión de RUNX mediante el uso de RUNX y CBF β endógenos. CBF β -SMMHC se expresa en estas células, lo que da lugar a la represión de la expresión de la luciferasa. Tal y como se muestra en el panel inferior de la figura 10, la eliminación de CBF β -SMMHC por los siRNA da como resultado una mayor actividad luciferasa. Del mismo modo, el tratamiento de las células con **AI-4-83** da como resultado un aumento dependiente de la dosis de la actividad luciferasa, lo que recapitula el efecto del siRNA. Estos datos demuestran la liberación de la represión por el inhibidor dimérico en un promotor regulado por RUNX, lo que demuestra el efecto deseado sobre la transcripción en un sitio funcional.

Efectos del inhibidor dimérico sobre las células mononucleares de la médula ósea humana y una muestra de paciente con inv(16). Hemos comprobado (la toxicidad de) el **AI-4-83** en las células mononucleares de la médula ósea humana y en una muestra de paciente inv(16) con el uso de un ensayo con MTT después de un tratamiento con el compuesto de 48 horas. En la figura 11 se muestra que el **AI-4-83** no tiene ningún efecto sobre la viabilidad de las células mononucleares de la médula ósea (CMN-MO) hasta 10 μ M, mientras que hubo un efecto sustancial en la muestra del paciente inv(16) a la dosis de 10 μ M. Estos datos indican una falta de toxicidad para las células mononucleares de la médula normal, mientras que hubo un efecto significativo en esta muestra de pacientes inv(16), lo que respalda su posible uso como índice terapéutico útil para esta clase de compuestos.

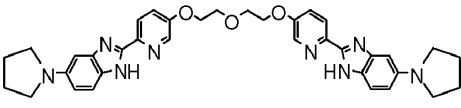
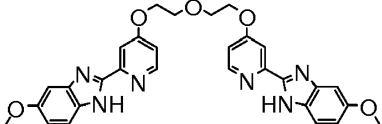
Efectos del inhibidor dimérico sobre las células iniciadoras de la leucemia de ratón. El laboratorio del Dr. Lucio Castilla ha identificado una población específica de células denominadas células iniciadoras de la leucemia con el uso de

modelos de leucemia inv(16) en los ratones (Kuo, Y.mH., et al., *Cbf beta-SMMHC induces distinct abnormal myeloid progenitors able to develop acute myeloid leukemia. Cancer Cell*, 2006. 9 (1): p. 57-68) Esta población de células retiene la inv(16), pero no posee las mutaciones secundarias asociadas a la enfermedad. Tras la adquisición de tales mutaciones secundarias, estas células pueden progresar a una leucemia manifiesta. Estas células también suelen ser más resistentes a la quimioterapia citotóxica tradicional y, por lo tanto, representan un grupo de células a partir de las que puede producirse una recidiva. Hemos comprobado el **AI-4-83** contra este grupo de células y se demostró que el compuesto es muy eficaz a la hora de inducir la apoptosis en esta población. En la figura 12 se muestra que un tratamiento de 3 días con **AI-4-83** a 2 μ M daba como resultado una muerte celular del 80%, mientras que el compuesto no tuvo ningún efecto sobre las células mononucleares de la médula ósea normales, es decir, el inhibidor es extremadamente eficaz para erradicar esta población de células que son un impulso clave para la recidiva.

En la tabla 2 se da a conocer un resumen de la estructura y de la actividad de algunos de los nuevos compuestos diméricos preparados y comprobados en la presente memoria.

TABLA 2. Actividad de los dímeros de bencimidazol

Compuesto	Estructura	Cl ₅₀ FRET (μ M) (CBF β -SMMHC: RD, 20 nM ambos)	Δ (%)
AI-4-62 (o)		0,59	45
AI-4-83 (o)			
AI-10-66			
AI-4-82		1,1	72
AI-4-71		1,4	8
AI-10-19		1,9	30
AI-10-42		1,1	44
AI-10-99			
AI-10-49		0,75	44
AI-10-81		0,7	31
AI-10-55		16	56
AI-10-21		Interferencia con el ensayo.	

Compuesto	Estructura	Cl ₅₀ FRET (μM) (CBFβ-SMMHC: RD, 20 nM ambos)	Δ (%)
AI-10-98		Interferencia con el ensayo.	
AI-10-40		0,7	25

Conclusión

En la actualidad no hay agentes de acción selectiva que actúen sobre la proteína de fusión CBFβ-SMMHC. La quimioterapia estándar se usa para tratar esta enfermedad, por lo que esta sería el primer tratamiento dirigido para la leucemia inv(16).

Hemos demostrado la capacidad de desarrollar inhibidores con mayor selectividad por la proteína de fusión CBFβ-SMMHC que por la proteína CBFβ normal. Hasta donde sabemos, no se ha demostrado antes un nivel tan alto de selectividad.

Los compuestos que hemos desarrollado se dirigen contra una interacción proteína-proteína que es importante para la regulación transcripcional, lo que la convierte en una de una clase pequeña pero creciente de tales inhibidores.

El experto en la técnica apreciará que la superioridad de las composiciones y métodos de la invención con respecto a las composiciones y métodos de la técnica anterior no está relacionada con la exactitud fisiológica de la teoría que explica los resultados superiores.

Los encabezamientos se incluyen en la presente memoria para referencia y para ayudar a localizar ciertos apartados. No se pretende que estos encabezamientos limiten el alcance de los conceptos descritos a continuación, y estos conceptos pueden tener aplicabilidad en otros apartados a lo largo de toda la especificación.

Otros métodos que se usaron, pero que no se describen en la presente memoria, se conocen bien y están dentro de la competencia de un experto en la materia de las técnicas clínicas, química, celular, histoquímica, bioquímica, de biología molecular, de microbiología y de ADN recombinante.

La descripción de las realizaciones descritas se da a conocer para permitir que cualquier persona experta en la técnica ponga en marcha o use la presente invención. La presente invención no pretende limitarse a las realizaciones mostradas en la presente memoria, sino que debe concederse el alcance más amplio que respete las reivindicaciones.

Bibliografía

1. Adya, N., T. Stacy y col. (1998) "La cadena pesada de miosina del músculo beta del factor de unión a la proteína leucémica beta (CBFbeta) secuestra CBFalpha2 en filamentos y agregados del citoesqueleto". Mol Cell Biol 18 (12): 7432-43.

2. Alcalay, M., A. Orleth, et al. (2001) "Temas comunes en la patogénesis de la leucemia mieloide aguda". Oncogene 20 (40): 5680-94.

3. Arndt, H. D. (2006). "Moduladores de transcripción de moléculas pequeñas". Angew Chem Int Ed Engl 45 (28): 4552-60.

4. Backstrom, S., M. Wolf-Watz, y col. (2002) "El dominio RUNX1 Runt a 1.25Å de resolución: un interruptor estructural y iones de cloruro específicamente unidos modulan la unión del ADN". J Mol Biol 322 (2): 259.

5. Bartfeld, D., L. Shimon y col. (2002) "El reconocimiento de ADN por el factor de transcripción RUNX1 está mediado por una transición alostérica en el dominio RUNT y por la flexión de ADN". Estructura (Camb) 10 (10): 1395.

6. Bazin, H., M. Preaudat y col. (2001) "El tiempo homogéneo resolvió la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia utilizando criptatos de tierras raras como herramienta para explorar las interacciones moleculares en biología". Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 57 (11): 2197-211.

7. Berardi, M. J., C. Sun, et al. (1999) "El doblez de Ig del dominio del factor de unión central alfa Runt es un miembro de una familia de dominios de unión a ADN de doblez de Ig relacionados estructural y funcionalmente". Despliegue de estructura Des 7 (10): 1247-56.

8. Boeckx, N., V. H. van der Velden, y col. (2004) "Una leucemia mieloide aguda positiva inv (16) (p13q22) recidivante como leucemia linfoblástica de células B precursoras agudas". *Haematologica* 89 (8): ECR28.
9. Bravo y col. (2001) "El complejo AML1 asociado a leucemia (Runx1) - CBF beta funciona como una pinza molecular inducida por ADN". *Nat Struct Biol* 8 (4): 371-8.
- 5 10. Cai, Z., M. de Bruijn, et al. (2000) "La haploinsuficiencia de AML1 afecta la generación temporal y espacial de células madre hematopoyéticas en el embrión de ratón". *Inmunidad* 13 (4): 423-31.
11. Cao, W., M. Britos-Bray, y col. (1997) "CBF beta-SMMHC, expresado en M4Eo AML, redujo la unión al ADN de CBF e inhibió la transición del ciclo celular G1 a S en el punto de restricción en las células mieloides y linfoides". *Oncogene* 15 (11): 1315-27.
- 10 12. Castilla et al., 1999, El gen de fusión Cbfb-MYH11 bloquea la diferenciación mieloide y predispone a los ratones a la leucemia mielomonocítica aguda. *Nat Genet* 23 (2): 144-6.
13. Castilla, L. H., P. Perrat, et al. (2004) "Identificación de genes que sinergizan con Cbfb-MYH11 en la patogénesis de la leucemia mieloide aguda". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (14): 4924-9.
- 15 14. Castilla, L. H., C. Wijmenga, et al. (1996) "Fracaso de la hematopoyesis embrionaria y hemorragias letales en embriones de ratón heterocigotos para un gen de leucemia noqueado CBFB-MYH11". *Celda* 87 (4): 687-96.
15. Castilla, L. H., C. Wijmenga, et al. (1996) "Defectos de hematopoyesis embrionaria y hemorragia letal en embriones de ratón heterocigotos para un gen de leucemia noqueado CBFB-MYH11". *Celda* 87: 687-696.
16. Cochran, A. G. (2000). "Antagonistas de las interacciones proteína-proteína". *Chem Biol* 7 (4): R85-94.
- 20 17. Crudo, B. E., A. F. Lewis, et al. (1996) "Propiedades bioquímicas y biofísicas del dominio de unión al ADN del factor de unión al núcleo alfa2 (AML1)". *J Biol Chem* 271 (42): 26251-60.
18. Dash, A. y D. G. Gilliland (2001). "Genética molecular de la leucemia mieloide aguda". *Best Pract Res Clin Haematol* 14 (1): 49-64.
19. Druker, B. J. (2004). "Imatinib como paradigma de las terapias dirigidas". *Adv Cancer Res* 91: 1-30.
- 25 20. Durst, K. L., B. Lutterbach, et al. (2003) "La proteína de fusión inv (16) se asocia con corepresores a través de un dominio de cadena pesada de miosina de músculo liso". *Mol Cell Biol* 23 (2): 607-19.
21. Efeyan, A., A. Ortega-Molina, et al. (2007) "Inducción de la senescencia dependiente de p53 por el antagonista de MDM2 nutlin-3a en células de ratón de origen de fibroblastos". *Cancer Res* 67 (15): 7350-7.
- 30 22. Farag, S. S., K. J. Archer, et al. (2006) "La citogenética previa al tratamiento se suma a otros factores pronósticos que predicen la remisión completa y el resultado a largo plazo en pacientes de 60 años de edad o mayores con leucemia mieloide aguda: resultados de Cancer and Leukemia Group B 8461." *Sangre* 108 (1): 63-73.
23. Feng, B. Y. y B. K. Shoichet (2006). "Un ensayo a base de detergente para la detección de inhibidores promiscuos". *Nat Protocol* 1 (2): 550-3.
24. Friesner, R. A., J. L. Banks, et al. (2004) "Glide: un nuevo enfoque para un anclaje y puntuación rápidos y precisos. 1. Método y evaluación de la precisión del acoplamiento". *J Med Chem* 47 (7): 1739-49.
- 35 25. Friesner, R. A., R. B. Murphy, et al. (2006) "Deslizamiento de precisión adicional: acoplamiento y puntuación que incorpora un modelo de cerramiento hidrófobo para complejos de proteína-ligando". *J Med Chem* 49 (21): 6177-96.
26. Fry, D. C. (2006). "Interacciones proteína-proteína como objetivos para el descubrimiento de fármacos de molécula pequeña". *Biopolímeros* 84 (6): 535-52.
- 40 27. Gadek, T. R. y J. B. Nicholas (2003). "Pequeños antagonistas de moléculas de proteínas". *Biochem Pharmacol* 65 (1): 1-8.
28. Gilliland, D. G. y M. S. Tallman (2002). "Centrarse en las leucemias agudas". *Célula cancerosa* 1 (5): 417-20.
29. Goger, M., V. Gupta, et al. (1999) "Los conocimientos moleculares sobre la leucemia aguda asociada a PEBP2/CBF beta-SMMHC revelados a partir de la estructura de PEBP2/CBF beta". *Nat Struct Biol* 6 (7): 620-3.
30. Goldenberg, D. P. (2003). "Simulación computacional de las propiedades estadísticas de las proteínas desplegadas". *J Mol Biol* 326 (5): 1615-33.
- 45 31. Gorczynski, M. J., J. Grembecka y col. (2007) "Inhibición alostérica de la interacción proteína-proteína entre las proteínas asociadas a la leucemia Runx1 y CBFbeta". *Chem Biol* 14 (10): 1186-97.

32. Halgren, T. A., R. B. Murphy, et al. (2004) "Glide: un nuevo enfoque para la fijación y puntuación rápidas y precisas. 2. Factores de enriquecimiento en la detección de bases de datos". *J Med Chem* 47 (7): 1750-9.
33. Hiebert, S. W., B. Lutterbach, et al. (2001) "Papel de los correpresores en la represión transcripcional mediada por las proteínas de fusión t (8; 21), t (16; 21), t (12; 21) e inv (16)". *Curr Opin Hematol* 8 (4): 197-200.
- 5 34. Ho, C. Y., B. Otterud, y col. (1996) "Vinculación de un trastorno plaquetario familiar con una propensión a desarrollar neoplasias malignas mieloides con el cromosoma humano 21q22.1-22.2". *Sangre* 87 (12): 5218-24.
35. Huang, X., J. W. Peng, y col. (1999) "Estructura de la solución del factor de unión central beta y mapa del sitio de unión alfa de CBF". *Nat Struct Biol* 6 (7): 624-7.
- 10 36. Imbert, P. E., V. Unterreiner, et al. (2007) "Recomendaciones para la reducción de artefactos compuestos en ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia resueltos en el tiempo". *Ensayo Drug Dev Technol* 5 (3): 363-72.
37. Kanno, Y., T. Kanno, y col. (1998) "El secuestro citoplasmático de la subunidad alfa (CBFalpha) de la proteína de unión al potenciador de poliomavirus 2 (PEBP2)/factor de unión al núcleo por la proteína de fusión PEBP2/CBFbeta-SMMHC relacionada con la leucemia inhibe la transactivación mediada por PEBP2/CBF". *Mol Cell Biol* 18 (7): 4252-61.
- 15 38. Kiessling, L. L., J. E. Gestwicki, et al. (2006) "Ligandos sintéticos multivalentes como sondas de transducción de señales". *Angewandte Chemie-Edición internacional* 45 (15): 2348-2368.
39. Kottaridis, P. D., R. E. Gale y col. (2002) "Estudios de mutaciones FLT3 en muestras emparejadas de presentación y recaída de pacientes con leucemia mieloide aguda: implicaciones para el papel de las mutaciones FLT3 en la leucemogénesis, detección mínima de enfermedad residual y posible terapia con inhibidores FLT3". *Sangre* 100 (7): 2393-8.
- 20 40. Kuo, Y. H., S. F. Landrette, et al. (2006) "Cbf beta-SMMHC induce progenitores mieloides anormales distintos capaces de desarrollar leucemia mieloide aguda". *Cancer Cell* 9 (1): 57-68.
41. Lacaud, G., V. Kouskoff, y col. (2004) "La haploinsuficiencia de Runx1 resulta en la aceleración del desarrollo mesodérmico y la especificación de hemangioblastos tras la diferenciación in vitro de las células ES". *Sangre* 103 (3): 886-9.
- 25 42. Li, Z., J. Yan y col. (2003) "Contribución energética de los residuos en el dominio Runx1 Runt a la unión del ADN". *J Biol Chem* 278: 33088-33096.
43. Liu, P., S. A. Tarle y col. (1993) "Fusión entre el factor de transcripción CBF beta/PEBP2 beta y una cadena pesada de miosina en la leucemia mieloide aguda". *Ciencia* 261 (5124): 1041-4.
- 30 44. Liu, P. P., C. Wijmenga, et al. (1996) "Identificación del producto proteico quimérico del gen de fusión CBFbeta-MYH11 en células de leucemia inv (16)". *Genes Cromosomas Cáncer* 16 (2): 77-87.
45. Mira, A. T. (1997). "Factores de transcripción oncogénicos en las leucemias agudas humanas". *Science* 278 (5340): 1059-64.
- 35 46. Lu, J., M. Maruyama, y col. (1995) "Localización subcelular de las subunidades alfa y beta del factor de transcripción ligado a leucemia mieloide aguda PEBP2/CBF". *Mol Cell Biol* 15 (3): 1651-61.
47. Lukasik, S. M., L. Zhang, y col. (2002) "La afinidad alterada de CBFbeta-SMMHC por Runx1 explica su papel en la leucemogénesis". *Nat Struct Biol* 9 (9): 674-9.
48. Lutterbach, B., Y. Hou y col. (1999) "El inv (16) codifica un corepresor transcripcional de leucemia mieloide aguda 1". *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (22): 12822-7.
- 40 49. Lydon, N. B. y B. J. Druker (2004). "Lecciones aprendidas del desarrollo de imatinib". *Leuk Res* 28 Supl 1: S29-38.
50. Mammen, M., S. K. Choi, y col. (1998) "Interacciones polivalentes en sistemas biológicos: implicaciones para el diseño y uso de ligandos e inhibidores multivalentes". *Angewandte Chemie-Edición internacional* 37 (20): 2755-2794.
51. Markus, J., M. T. Garin y col. (2007) "Silenciamiento independiente de metilación del supresor tumoral INK4b (p15) por CBFbeta-SMMHC en leucemia mielógena aguda con inv (16)". *Cancer Res* 67 (3): 992-1000.
- 45 52. Mosmann, T. (1983). "Ensayo colorimétrico rápido para el crecimiento y la supervivencia celular: aplicación a ensayos de proliferación y citotoxicidad". *J Immunol Methods* 65 (1-2): 55-63.

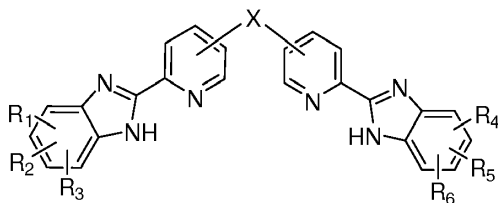
53. Mulder, A., T. Auletta y col. (2004) "La unión divalente de un calix [4] areno funcionalizado con bis (adamantilo) a hospedadores basados en beta-ciclodextrina: un estudio experimental y teórico sobre la unión multivalente en solución y en monocapas autoensambladas". *Revista de la American Chemical Society* 126 (21): 6627-6636.
54. Nagata, T., V. Gupta y col. (1999) "Reconocimiento de ADN con motivo de inmunoglobulina y heterodimerización del dominio Runt de PEBP2/CBF". *Nat Struct Biol* 6 (7): 615-9.
55. Nakano, Y., H. Kiyoi y col. (1999) "Evolución molecular de la leucemia mieloide aguda en la recaída: genes inestables de N-ras y FLT3 en comparación con el gen p53". *Fr. J. Haematol* 104 (4): 659-64.
56. Norte, T. E., M. F. de Bruijn, et al. (2002) "La expresión de Runx1 marca las células madre hematopoyéticas repobladas a largo plazo en el embrión de ratón midgestation". *Inmunidad* 16 (5): 661-72.
57. Okuda, T., J. van Deursen y col. (1996) "AML1, el objetivo de las translocaciones cromosómicas múltiples en la leucemia humana es esencial para la hematopoyesis hepática fetal normal". *Celda* 84 (2): 321-30.
58. Okuda, T., J. van Deursen y col. (1996) "AML1, el objetivo de las translocaciones cromosómicas múltiples en la leucemia humana es esencial para la hematopoyesis hepática fetal normal". *Celda* 84: 321-330.
59. Osato, M., M. Yanagida, et al. (2001) "Mutaciones puntuales del gen RUNX1/AML1 en leucemias mieloides esporádicas y familiares". *Int J Hematol* 74 (3): 245-51.
60. Pellecchia, M., D. S. Sem, y col. (2002) "RMN en el descubrimiento de fármacos". *Nat Rev Drug Discov* 1 (3): 211-9.
61. Pérez-Alvarado, G. C., A. Munnerlyn, et al. (2000) "Identificación de las regiones involucradas en la unión del ADN por la proteína de ratón PEBP2 alfa". *FEBS Lett* 470 (2): 125-30.
62. Pulsoni, A., S. Iacobelli, y col. (2008) "Leucemia mieloide aguda M4: el papel de la eosinofilia y la citogenética en la respuesta al tratamiento y la supervivencia. La experiencia GIMEMA". *Haematologica* 93 (7): 1025-32.
63. Ravandi, F., A. K. Burnett, y col. (2007) "Progreso en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda". *Cáncer* 110 (9): 1900-10.
64. Reilly, J. T. (2005). "Patogenia de la leucemia mieloide aguda y inv (16) (p13; q22): ¿un paradigma para comprender la leucemogénesis?" *Fr. J. Haematol* 128 (1): 18-34.
65. Salvatella, X. y E. Giralt (2003). "Métodos y estrategias basados en RMN para el descubrimiento de fármacos". *Chem Soc Rev* 32 (6): 365-72.
66. Sasaki, K., H. Yagi y col. (1996) "Ausencia de hematopoyesis hepática fetal en ratones deficientes en el factor de unión del núcleo coactivador transcripcional beta". *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (22): 12359-63.
67. Sasaki, K., H. Yagi y col. (1996) "Ausencia de hematopoyesis hepática fetal en coactivador transcripcional, ratones deficientes en el factor de unión al núcleo b (Ctcf)". *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 93: 12359-12363.
68. Seidler y col. (2003) "Identificación y predicción de inhibidores de agregación promiscuos entre fármacos conocidos". *J Med Chem* 46 (21): 4477-86.
69. Shangary, S., D. Qin y col. (2008) "La activación temporal de p53 por un inhibidor específico de MDM2 es selectivamente tóxico para los tumores y conduce a la inhibición completa del crecimiento tumoral". *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (10): 3933-8.
70. Sharma, S. V. y J. Settleman (2007). "Adicción a los oncogenes: preparando el escenario para la terapia del cáncer dirigida molecularmente". *Genes Dev* 21 (24): 3214-31.
71. Shigesada, K., B. van de Sluis, et al. (2004) "Mecanismo de leucemogénesis por el gen quimérico inv (16) CBFb/PEBP2B-MHY11". *Oncogene* 23 (24): 4297-307.
72. Shih y col. (2008) "Mutaciones cooperantes de los receptores de tirosina quinasas y genes Ras en la leucemia mieloide aguda del factor de unión al núcleo infantil y un análisis comparativo en muestras emparejadas de diagnóstico y recaída". *Leucemia* 22 (2): 303-7.
73. Song y col. (1999) "La insuficiencia de CBFA2 causa trombocitopenia familiar con propensión a desarrollar leucemia mielógena aguda". *Nat Genet* 23 (2): 166-75.
74. Tahirou y col. 2001, Análisis estructurales del reconocimiento de ADN por el dominio AML1/Runx-1 Runt y su control alostérico por CBFbeta. *Celda* 104 (5): 755-67.
75. Talebian, L., Z. Li y col. (2007) "El desarrollo de linfoides T, megacariocitos y granulocitos es sensible a la disminución de la dosis de CBFbeta". *Sangre* 109 (1): 11-21.

76. Tang, Y. Y., B. E. Crute, et al. (2000) "Caracterización biofísica de las interacciones entre las subunidades alfa y beta del factor de unión central y el ADN". FEBS Lett 470 (2): 167-72.
77. Tang, Y. Y., J. Shi, y col. (2000) "Contribución energética y funcional de los residuos en la subunidad del factor de unión central beta (CBFbeta) a la heterodimerización con CBFalpha". J Biol Chem 275 (50): 39579-88.
- 5 78. Toogood, P. L. (2002). "Inhibición de la asociación proteína-proteína por moléculas pequeñas: enfoques y progreso". J Med Chem 45 (8): 1543-58.
79. Tovar, C., J. Rosinski, y col. (2006) "Los antagonistas de MDM2 de molécula pequeña revelan la señalización anormal de p53 en el cáncer: implicaciones para la terapia". Proc Natl Acad Sci U S A 103 (6): 1888-93.
- 10 80. Vassilev, L. T., B. T. Vu, et al. (2004) "Activación in vivo de la vía p53 por antagonistas de moléculas pequeñas de MDM2". Ciencia 303 (5659): 844-8.
81. Veselovsky, A. V., Y. D. Ivanov, y col. (2002) "Interacciones proteína-proteína: mecanismos y modificación por drogas". J Mol Recognit 15 (6): 405-22.
82. Wang, Q., T. Stacy y col. (1996) "La interrupción del gen Cbfa2 causa necrosis y hemorragia en el sistema nervioso central y bloquea la hematopoyesis definitiva". Proc Natl Acad Sci U S A 93 (8): 3444-9.
- 15 83. Wang, Q., T. Stacy y col. (1996) "La interrupción del gen Cbfa2 causa necrosis y hemorragia en el sistema nervioso central y bloquea la hematopoyesis definitiva". Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 93: 3444-3449.
84. Wang, Q., T. Stacy y col. (1996) "La subunidad CBFbeta es esencial para la función in vivo de CBFalpha2 (AML1)". Celda 87 (4): 697-708.
- 20 85. Wang, Q., T. Stacy y col. (1996) "La subunidad CBFb es esencial para la función in vivo de CBFa2 (AML1)". Celda 87: 697-708.
86. Weinstein, I. B. y A. Joe (2008). "Adicción a los oncogenes". Cancer Res 68 (9): 3077-80; discusión 3080.
87. Xu, M., D. Li y col. (2007) "La proteína de fusión leucemogénica AML1-ETO aumenta la formación de aducto carcinógeno-ADN con la expresión regulada por incremento del gen del citocromo P450-1A1". Exp. Hematol 35 (8): 1249-55.
- 25 88. Yan, J., Y. Liu y col. (2004) "CBFbeta regula alostéricamente el dominio Runx1 Runt a través de un equilibrio conformacional dinámico". Nat Struct Mol Biol 11 (9): 901-6.
89. Yanagisawa, K., T. Horiuchi, et al. (1991) "Establecimiento y caracterización de una nueva línea celular de leucemia humana derivada de M4E0". Sangre 78 (2): 451-7.
- 30 90. Zhang, L., Z. Li, y col. (2003) "La mutagénesis del dominio Runt define dos puntos calientes energéticos para la heterodimerización con la subunidad beta del factor de unión al núcleo". J Biol Chem 278: 33097-33104.

REIVINDICACIONES

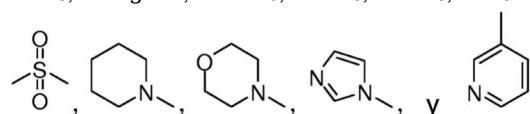
1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula:

Formula 7

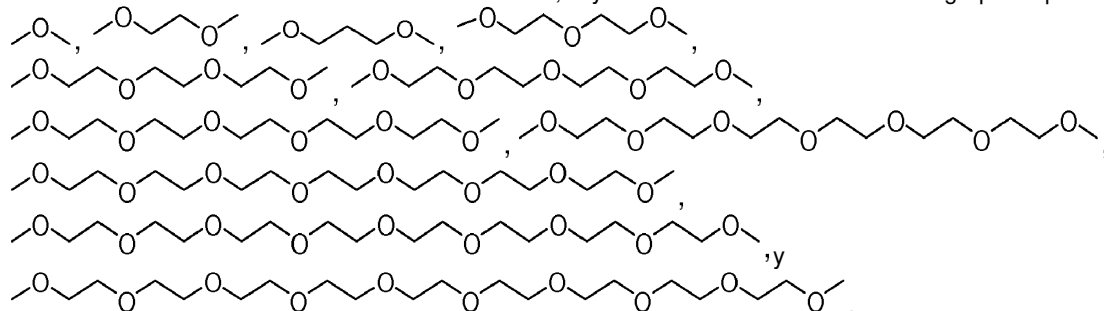


en donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se selecciona cada uno independientemente de hidrógeno, -OH, -COOH, -OCNH₂, -

5 OCH₃, halógeno, -OC₂H₅, -SCH₃, -OCF₃, -CF₃, N, O, S, ,

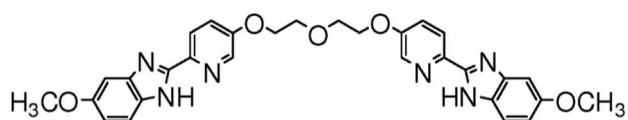


; y X se selecciona del grupo que consiste en

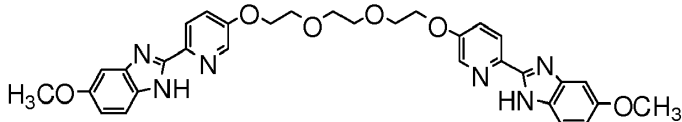


o una sal, enantiómero, polimorfo o tautómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

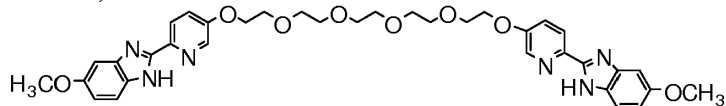
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



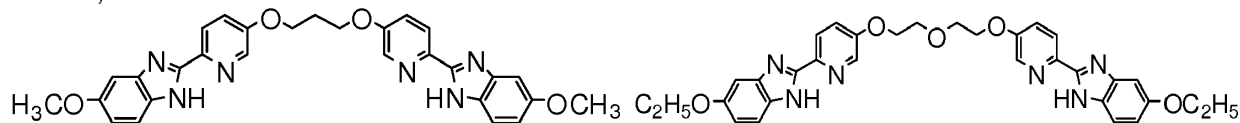
Al-4-62 o Al-4-83, o Al-10-66,



Al-4-82,

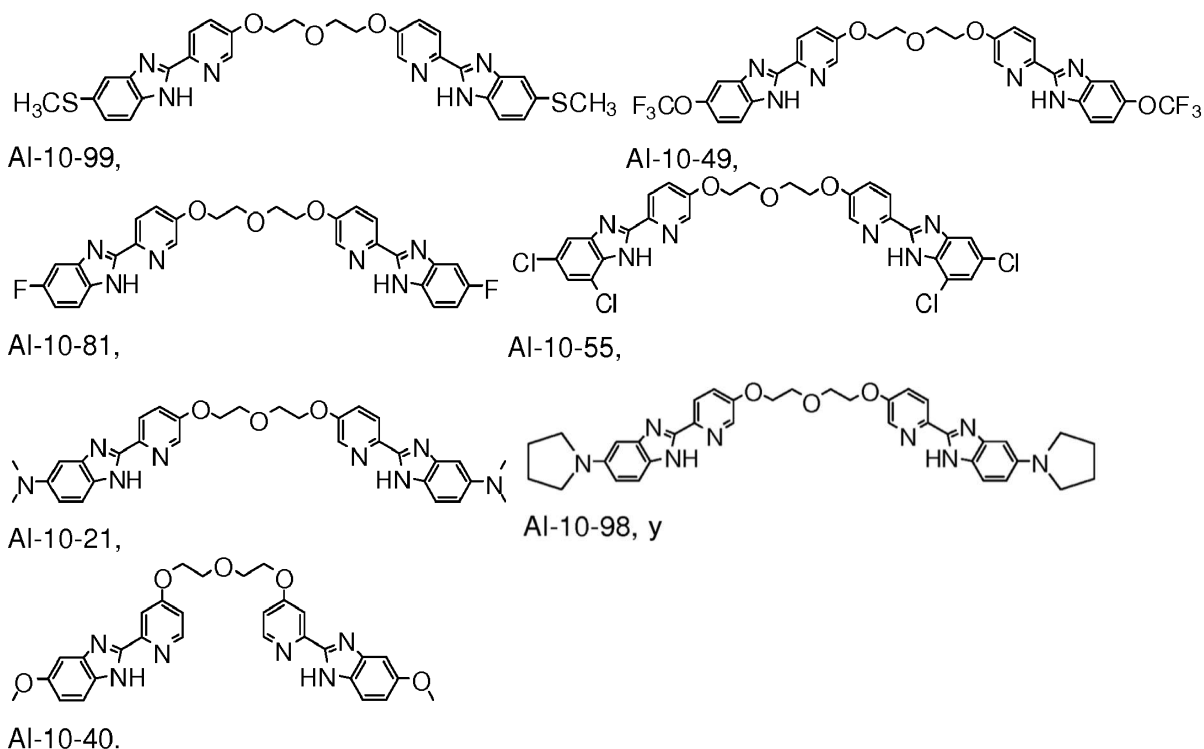


Al-4-71,



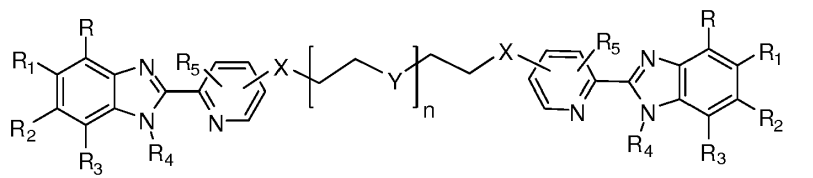
Al-10-19,

Al-10-42,



5 3. Un compuesto de acuerdo con la fórmula:

Formula 2



en donde,

10 R_5 está sustituido independientemente en m y p con piridina -N, H, -OH, -O-alquilo(C₁₋₄), -OR^a, trifluoroalcoxi(C₁₋₄), -S-alquilo(C₁₋₄), -S-R^a, -SO₂-alquilo(C₁₋₄), -SO₂-R^a, -SO-alquilo(C₁₋₄), -SO-R^a, -SO₂-NH-R^b, -NR^cR^d, halo, -alquilo(C₁₋₄), -alquilo(C₅₋₁₂), -alqueno(C₂₋₆), -alquino(C₂₋₆), un carbociclo monocíclico, policíclico o espirocarbocíclico saturado o parcialmente saturado que tiene de 3 a 6 átomos por carbociclo, fenilo, bencilo o anillo heteroarilo monocíclico, en el que el fenilo, bencilo o anillo heteroarilo monocíclico está opcionalmente sustituido con R^b,

15 un carbociclo monocíclico, policíclico o espirocarbocíclico saturado o parcialmente saturado que tiene de 3 a 6 átomos por carbociclo, que opcionalmente contiene O, S, N o hidrógeno, -OC(O)-R^b, -P(O)(OR^b)₁₋₂, -P(S)(OR^b)₁₋₂, -P(O)(NR^cR^d)₁₋₂, -P(S)(NR^cR^d)₁₋₂, -O(CH₂-CH₂-O)₁₋₄CH₃, -CN, -COOH, -NO₂, -C(O)-alquilo(C₁₋₄), o -C(O)-R^b;

cada X está sustituido independientemente en m y p con piridina -N, o independientemente -O, -NH o -S, en donde n es un número entero de 1 a 10;

Y es oxígeno, -NH, o -NR^f, en donde R^f es metilo o etilo;

20 R, R₁, R₂ y R₃ son independientemente -OH, -O-alquilo(C₁₋₄), -OR^a, trifluoroalcoxi(C₁₋₄), -S-alquilo(C₁₋₄), -S-R^a, -SO₂-alquilo(C₁₋₄), -SO₂-R^a, -SO-alquilo(C₁₋₄), -SO-R^a, -SO₂-NH-R^b, -NR^cR^d, halo, -alquilo(C₁₋₄), -alquilo(C₅₋₁₂), -alqueno(C₂₋₆), -alquino(C₂₋₆), un carbociclo monocíclico, policíclico o espirocarbocíclico saturado o parcialmente saturado que tiene de 3 a 6 átomos por carbociclo, fenilo, bencilo o anillo heteroarilo monocíclico, en el que el fenilo, bencilo o anillo heteroarilo monocíclico está opcionalmente sustituido con R^b, un carbociclo monocíclico, policíclico o espirocarbocíclico saturado o parcialmente saturado que tiene de 3 a 6 átomos por carbociclo, que opcionalmente contiene O, S, N o hidrógeno, -OC(O)-R^b, -P(O)(OR^b)₁₋₂, -P(S)(OR^b)₁₋₂, -P(O)(NR^cR^d)₁₋₂, -P(S)(NR^cR^d)₁₋₂, -O(CH₂-CH₂-O)₁₋₄CH₃, -CN, -COOH, -NO₂, -C(O)-alquilo(C₁₋₄), o -C(O)-R^b;

25

R^a es un carbociclo monocíclico, policíclico o espirocarbocíclico saturado o parcialmente saturado que tiene de 3 a 6 átomos por carbociclo, -alquenilo(C₂₋₆), -alquinilo(C₂₋₆), fenilo, bencilo o anillo heteroarilo monocíclico, en el que el fenilo, bencilo o anillo heteroarilo monocíclico está opcionalmente sustituido con R^b;

5 R^b es independientemente H, halo, -OH, -COOH, -alquilo(C₁₋₄), -alquilo(C₅₋₁₂), -alquenilo(C₂₋₆), -alquinilo(C₂₋₆), trifluoroalcoxi(C₁₋₄), -O-alquilo(C₁₋₄), -O(CH₂-CH₂-O)₁₋₄CH₃, -O-fenilo, -O-bencilo, -N-alquilo(C₁₋₄), -N-fenilo y -N-bencilo, -N-anillo heterociclo monocíclico, opcionalmente sustituido con R^b;

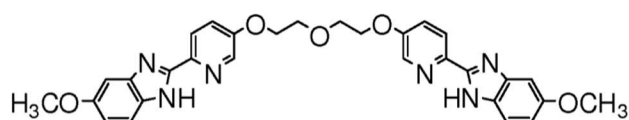
10 R^c y R^d son cada uno independientemente H, -alquilo(C₁₋₄), -C(O)-alquilo(C₁₋₄), -C(O)-R^e, -alquil(C₁₋₄)-R^e, -SO₂-R^a, -SO₂-alquilo(C₁₋₄), fenilo, bencilo o anillo heteroarilo monocíclico, en el que el fenilo, bencilo o anillo heteroarilo monocíclico está opcionalmente sustituido con R^b, y R^c y R^d tomados junto con el nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo monocíclico de 4 a 7 átomos de carbono sustituido que está saturado o parcialmente saturado y que tiene hasta dos heteroátomos, que contiene opcionalmente uno o más de O, S o N;

R^e es anillo monocíclico de 4 a 7 átomos de carbono que está saturado o parcialmente saturado y que tiene hasta dos heteroátomos, que opcionalmente contiene uno o más O, S o N; y

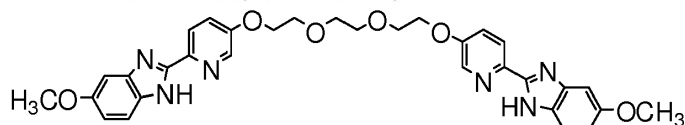
15 R₄ es H, -alquilo(C₁₋₄), -alquilo(C₅₋₁₂), ciclopropilo, fenilo, bencilo o anillo heteroarilo monocíclico, en el que el fenilo, bencilo o anillo heteroarilo monocíclico está opcionalmente sustituido con R^b, o -C(O)-R^b;

o una sal, enantiómero, polimorfo o tautómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

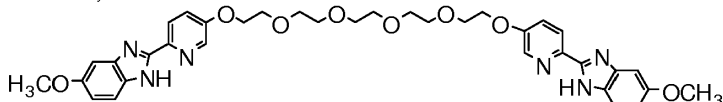
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



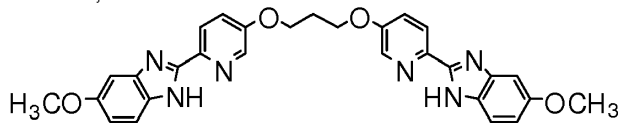
Al-4-62 o Al-4-83, o Al-10-66,



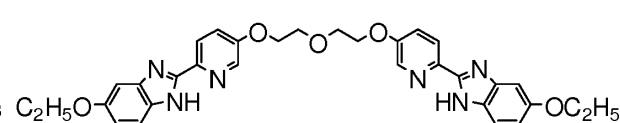
Al-4-82,



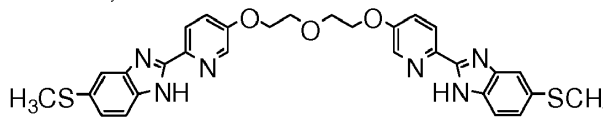
20 Al-4-71,



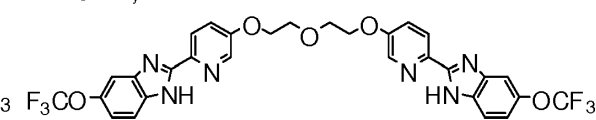
Al-10-19,



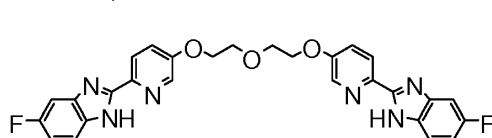
Al-10-42,



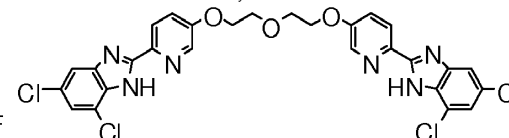
Al-10-99,



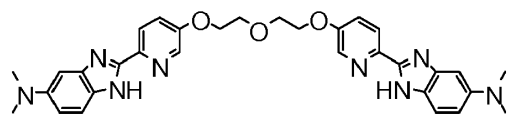
Al-10-49,



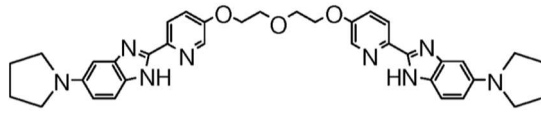
Al-10-81,



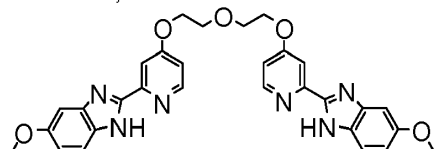
Al-10-55,



Al-10-21,



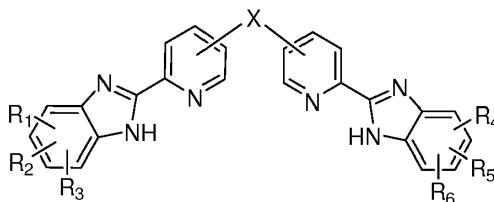
Al-10-98, y



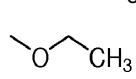
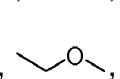
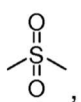
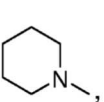
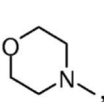
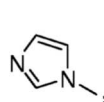
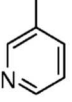
Al-10-40.

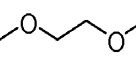
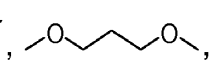
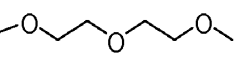
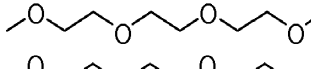
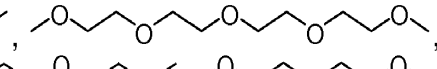
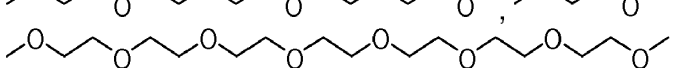
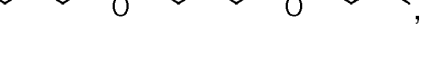
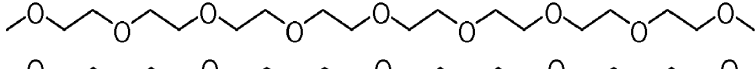
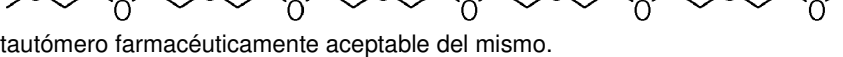
5. Un compuesto para usar en la prevención o el tratamiento de la leucemia inv(16), en donde el compuesto tiene la fórmula:

Formula 7

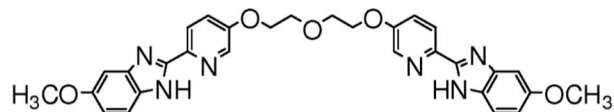


en donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se selecciona cada uno independientemente de hidrógeno, -OH, -COOH, -OCNH₂, -

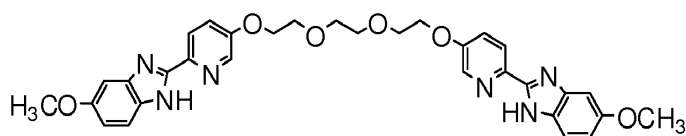
OCH₃, halógeno, -OC₂H₅, -SCH₃, -OCF₃, -CF₃, N, O, S, , , , , , , , , , , y  ;

y X se selecciona del grupo que consiste en , , , , , , , , , , , , , , , y  o una sal, enantiómero, polimorfo o tautómero farmacéuticamente aceptable del mismo.

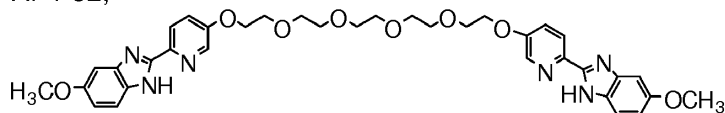
6. Un compuesto para usar en la prevención o el tratamiento de la leucemia inv(16), en el que cuando el compuesto es de acuerdo con la fórmula 7 definida en la reivindicación 5, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



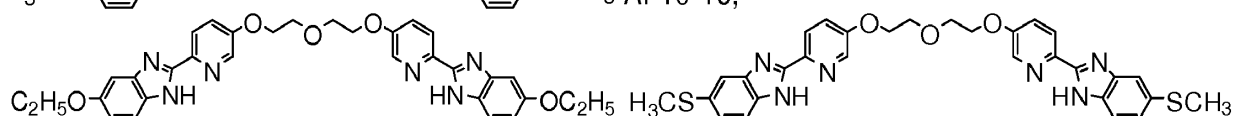
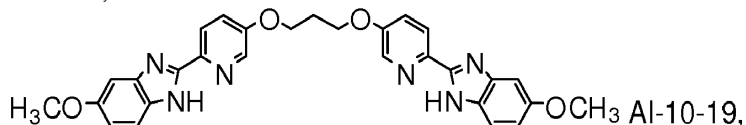
Al-4-62 o Al-4-83, o Al-10-66,



Al-4-82,

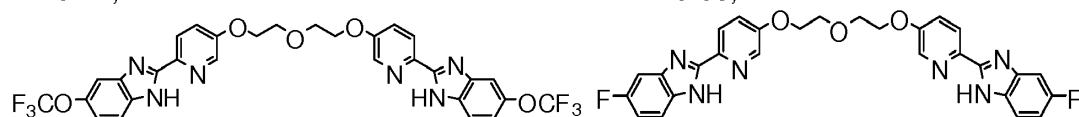


Al-4-71,



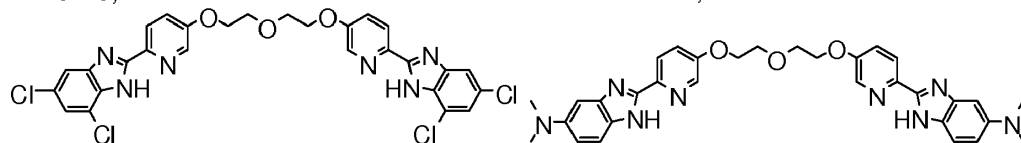
Al-10-42,

Al-10-99,



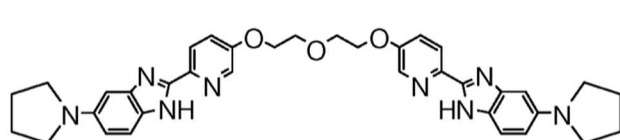
Al-10-49,

Al-10-81,

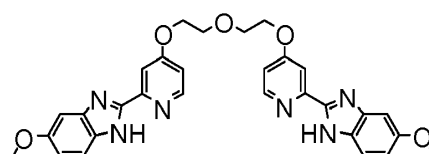


Al-10-55,

Al-10-21,



Al-10-98, y



Al-10-40.

7. Un compuesto para usar en la prevención o el tratamiento de la leucemia inv(16), en donde el compuesto es de acuerdo con una fórmula definida en cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde la leucemia inv(16) es la leucemia mieloide aguda.
8. Un compuesto para usar en la prevención o el tratamiento de la leucemia inv(16), en donde el compuesto es de acuerdo con una fórmula definida en cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde dicho compuesto inhibe la actividad de CBF β -SMMHC.
9. Un compuesto para usar en la prevención o el tratamiento de la leucemia inv(16), en donde el compuesto es de acuerdo con una fórmula definida en cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde dicho compuesto impide que CBF β -SMMHC interaccione con Runt.
10. Un compuesto para usar en la prevención o el tratamiento de la leucemia inv(16), en donde el compuesto es de acuerdo con una fórmula definida en cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde dicho compuesto se une a la porción CBF β de CBF β -SMMHC.
11. Un compuesto para usar en la prevención o el tratamiento de la leucemia inv(16), en donde el compuesto es de acuerdo con una fórmula definida en cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde dicho compuesto aumenta la apoptosis.

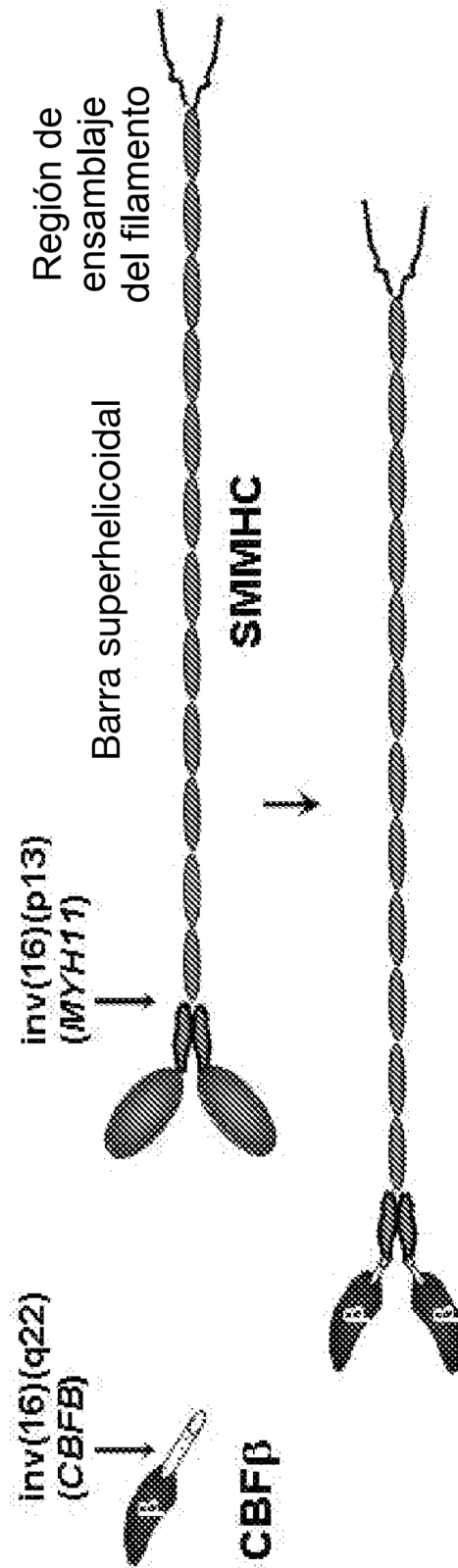


Figura 1

Ciclación reductora:

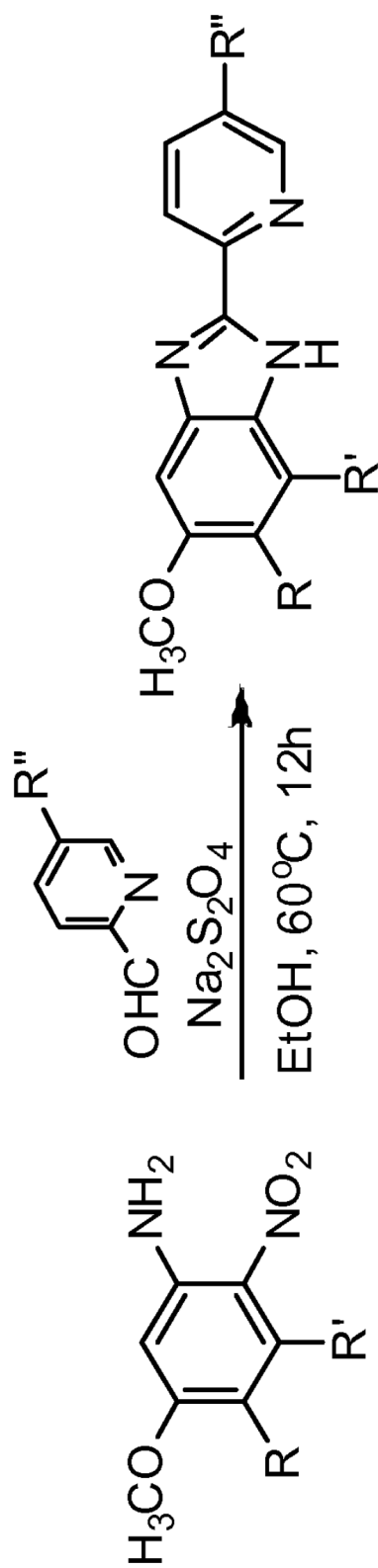


Figura 2

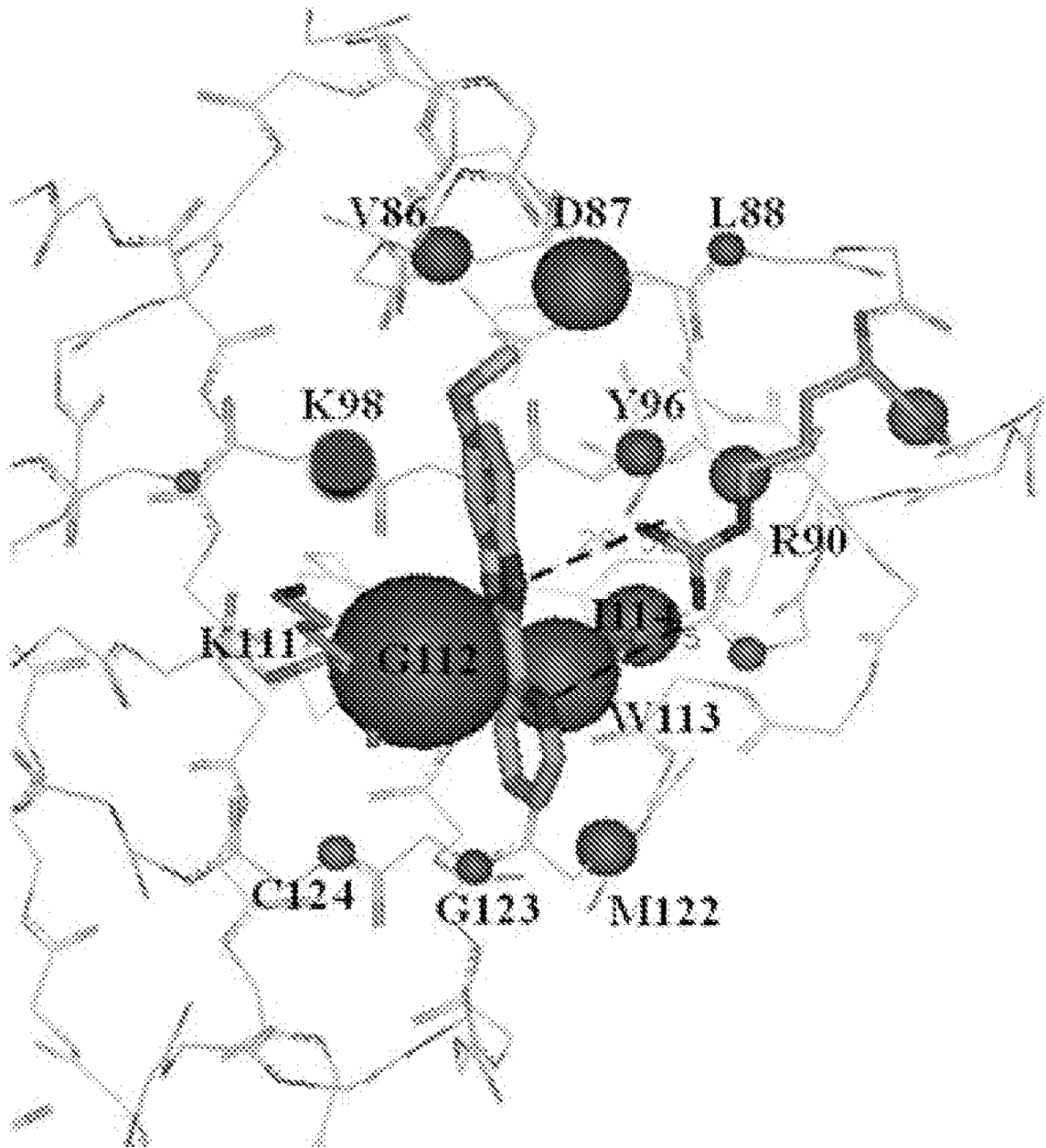


Figura 3

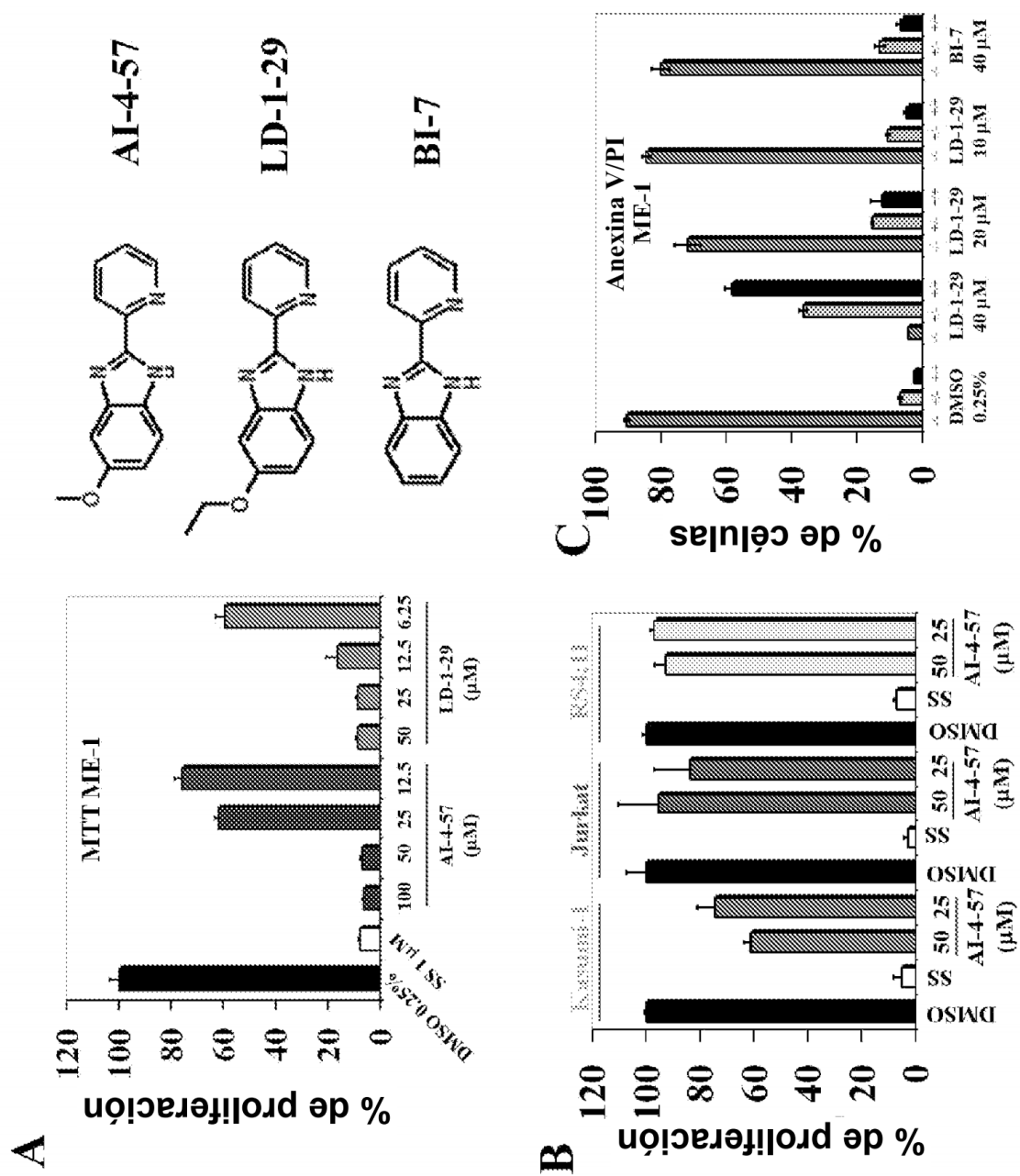


Figura 4

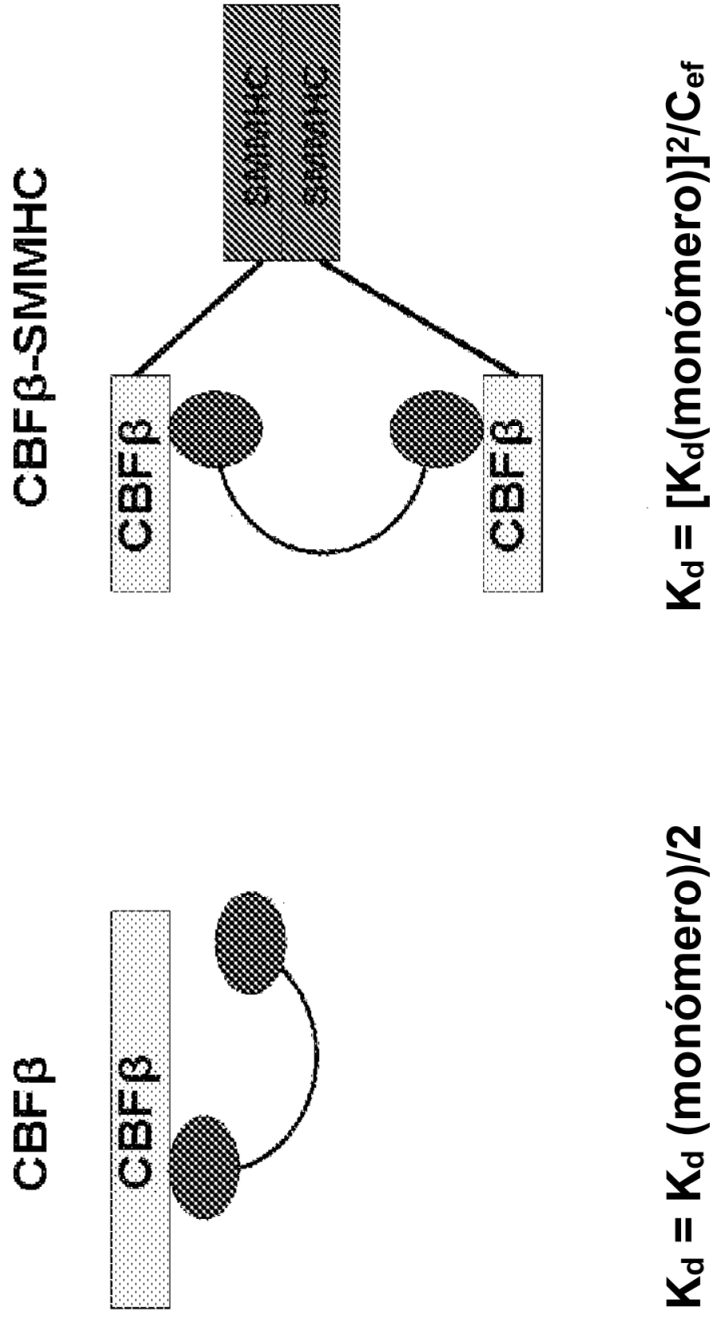
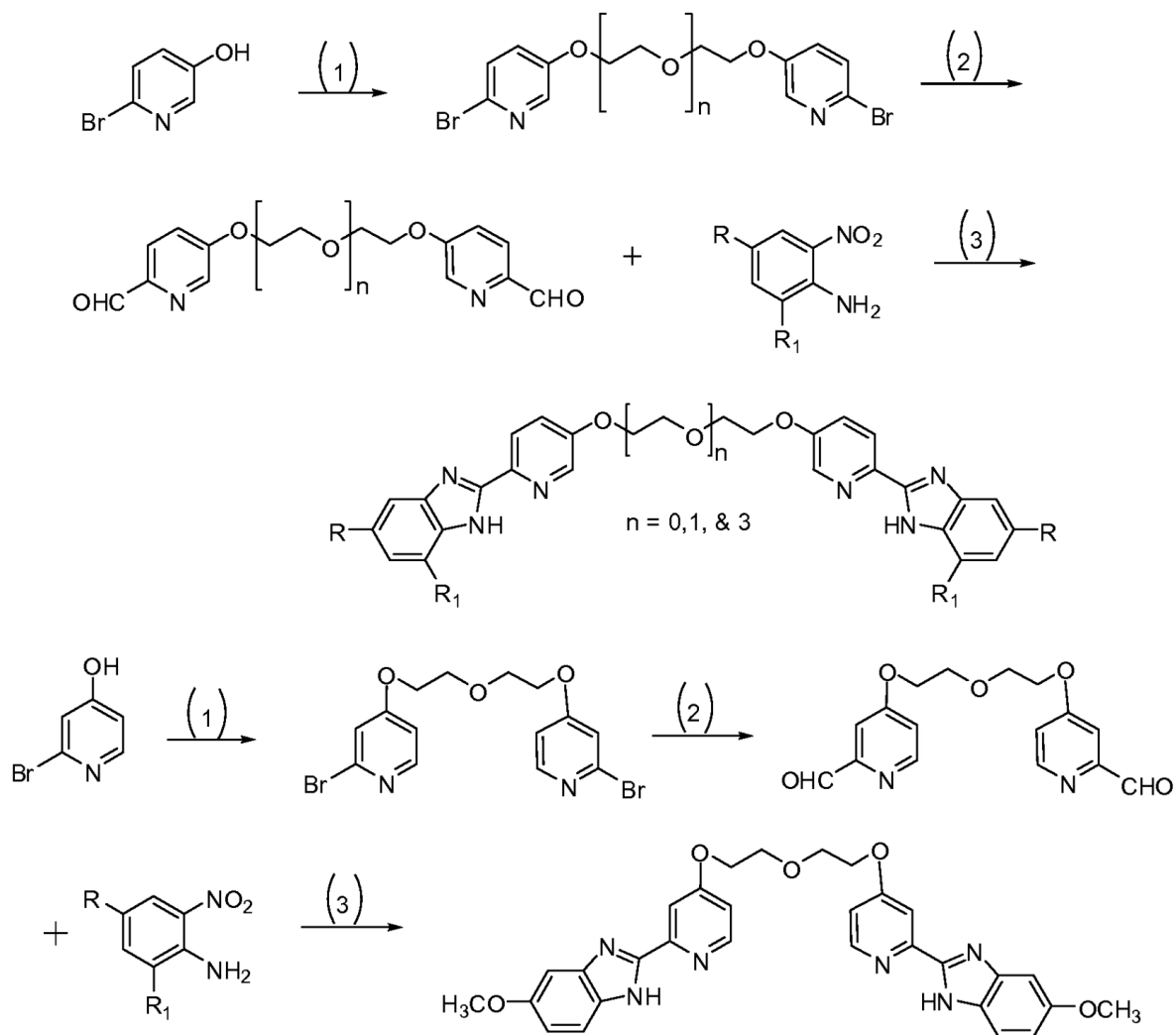


Figura 5



1. di(p-toluenosulfonato) de etilenglicol, K_2CO_3 , DMF, 80 °C

2. $n-BuLi$, DMF, - 78 °C a TA, THF

3. Nitroanilina, $Na_2S_2O_4$, EtOH, 70 °C

donde R, R_1 y n =

- | | |
|--|---|
| 1. R = $-OCH_3$, R_1 = H, n = 0 | 6. R = $-OCF_3$, R_1 = H, n = 0 |
| 2. R = $-OCH_3$, R_1 = H, n = 1 | 7. R = $-F$, R_1 = H, n = 0 |
| 3. R = $-OCH_3$, R_1 = H, n = 3 | 8. R = R_1 = $-Cl$, n = 0 |
| 4. R = $-OCH_2CH_3$, R_1 = H, n = 0 | 9. R = $-N(CH_3)_2$, R_1 = H, n = 0 |
| 5. R = $-SCH_3$, R_1 = H, n = 0 | 10. R = $-N$ (cyclopentyl ring), R_1 = H, n = 0 |

Figura 6

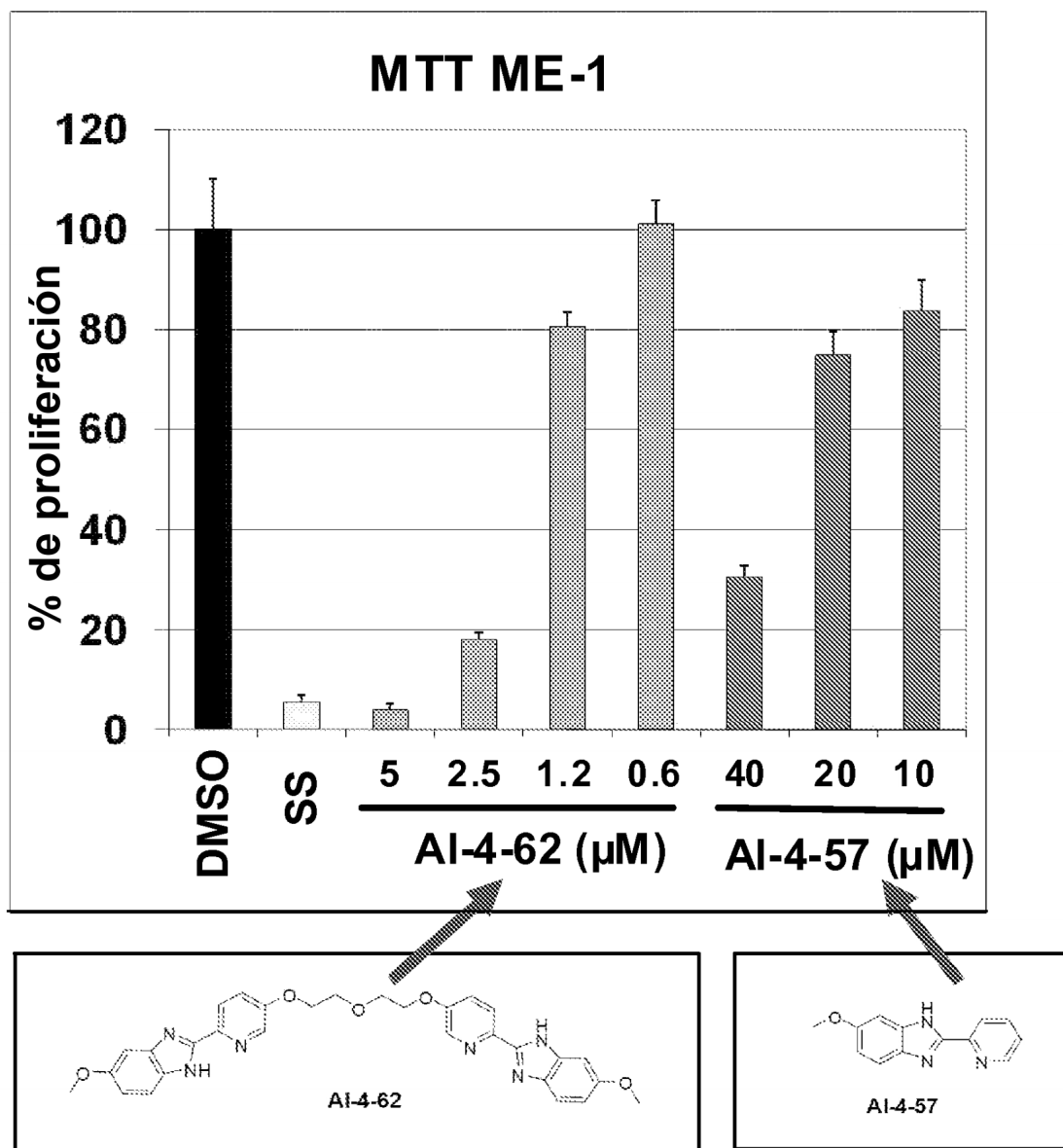


Figura 7

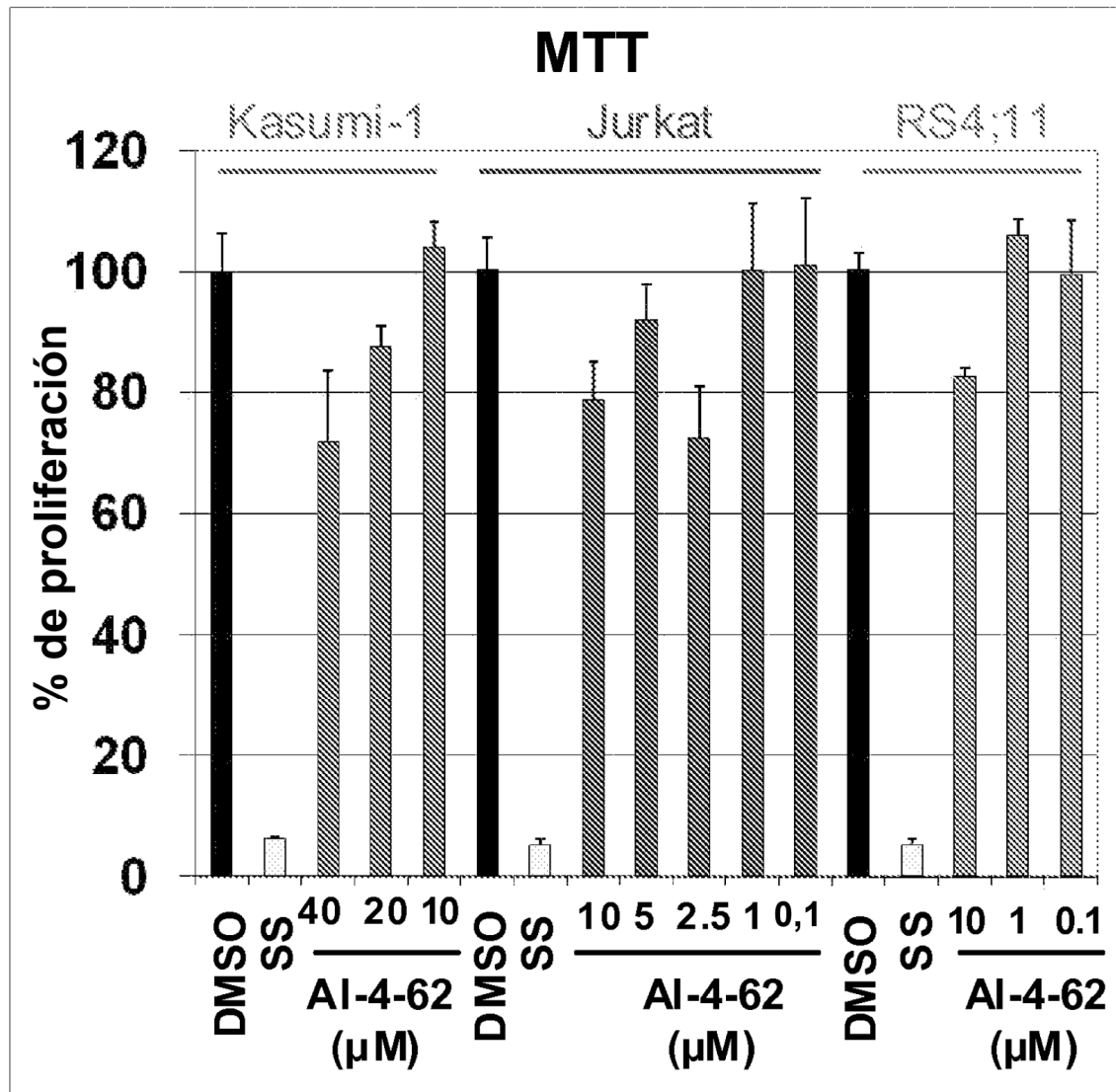


Figura 8

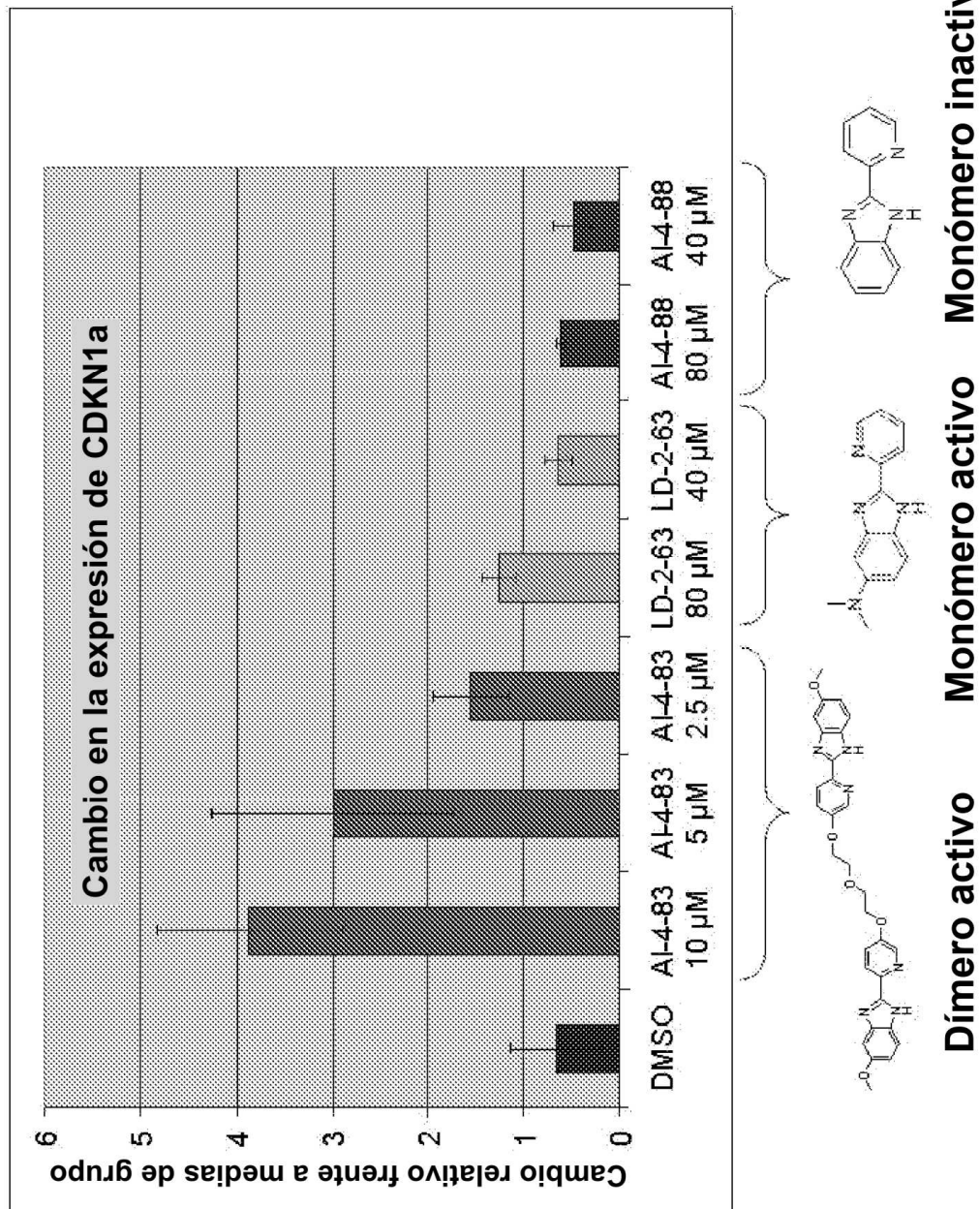
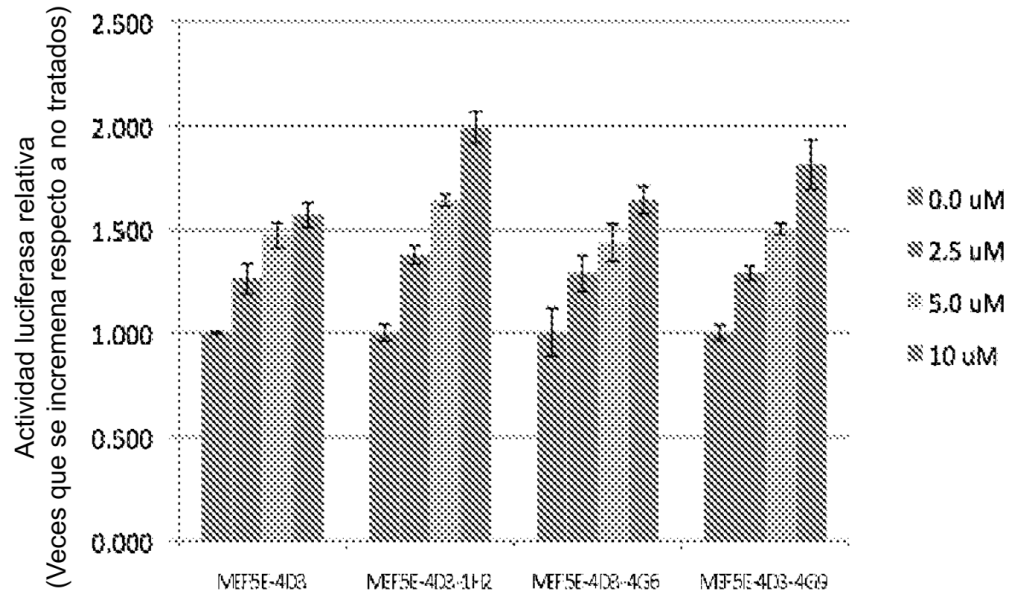


Figura 9

A

Respuesta a la dosis de AI-4-83 (48 h tx)



B

MEF5E-4D3: Tratamiento con siRNA anti-CM

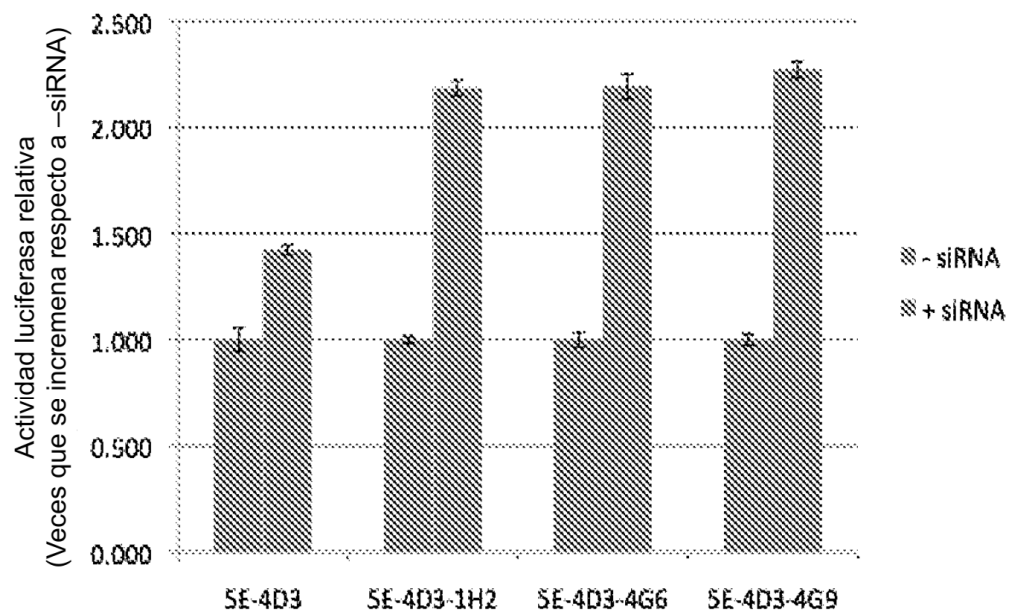


Figura 10

Efecto de Al-4-83 sobre el crecimiento de las CMN-MO y una muestra de paciente inv(16)

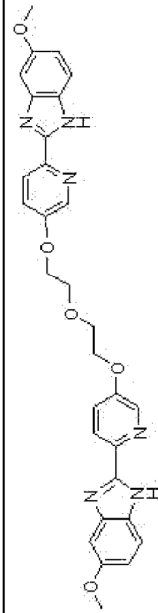
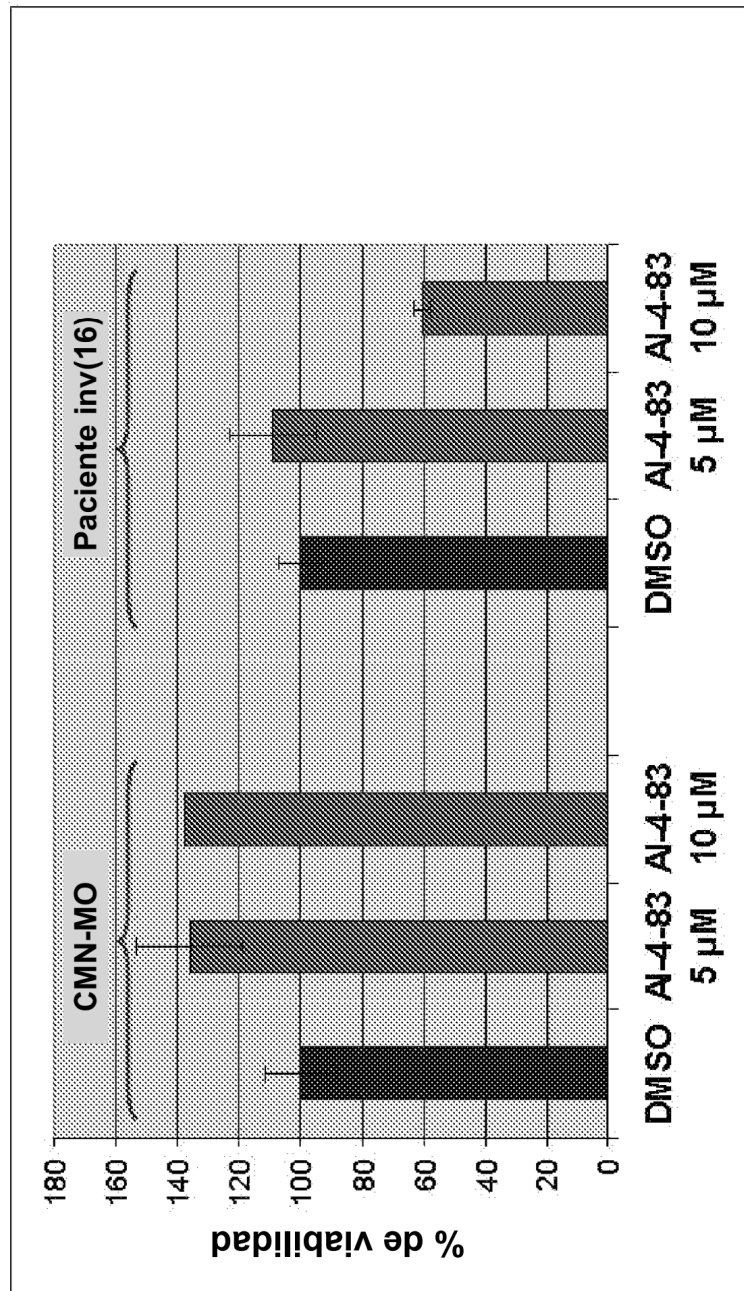


Figura 11

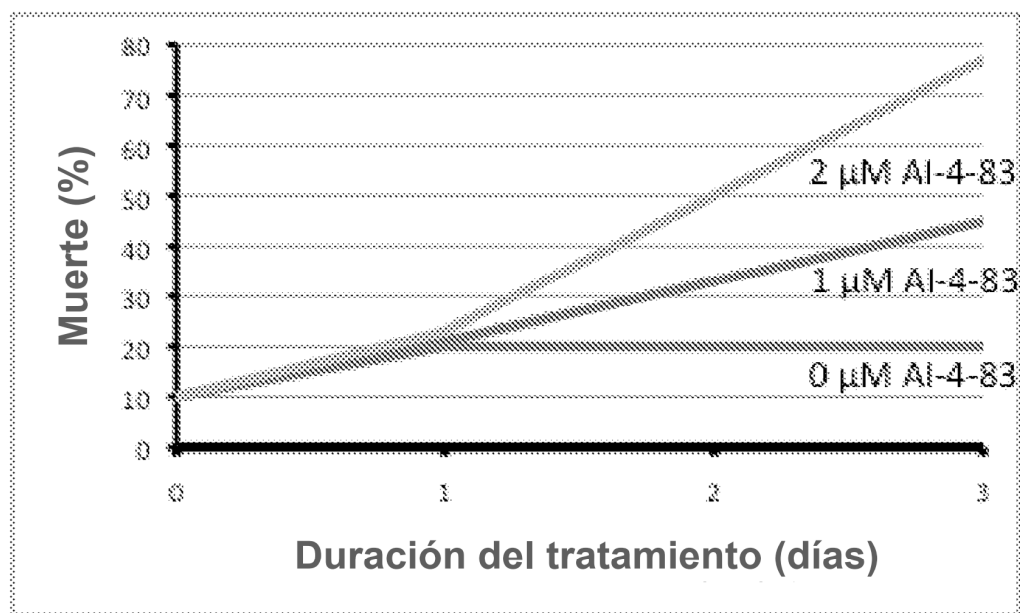


Figura 12