



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 059**

51 Int. Cl.:
A61K 31/404 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04793891 .5**
86 Fecha de presentación : **08.10.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1684747**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54 Título: **Bisindolilmaleimidas útiles para tratar el cáncer de próstata y enfermedades mediadas por AKT.**

30 Prioridad: **24.10.2003 US 514291 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2008

73 Titular/es: **ELI LILLY AND COMPANY**
Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285, US

72 Inventor/es: **Graff, Jeremy, Richard**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 307 059 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

Bisindolilmaleimidias útiles para tratar el cáncer de próstata y enfermedades mediadas por AKT.

5 Antecedentes de la invención

Las proteína quinasas están implicadas en las rutas de transducción de señales conectando factores de crecimiento, hormonas y otras moléculas de regulación celular con crecimiento celular, supervivencia y metabolismo en ambas afecciones, patológicas y normales. Una proteína quinasa de este tipo, la proteína quinasa B (también conocida como AKT), es una serina/treonina quinasa que desempeña un papel central en la promoción de la proliferación y supervivencia de una amplia gama de tipos de células, protegiendo así las células de la apoptosis (muerte celular programada) (Khwaja, *Nature* 33-34 (1990)). Se han identificado tres miembros de la subfamilia de AKT de proteína serina/treonina quinasas reguladas por un segundo mensajero y se denominan AKT-1, AKT-2 y AKT-3. Se han descrito varias proteínas implicadas en la supervivencia y proliferación celular como sustratos de AKT en células. Dos ejemplos de tales sustratos incluyen glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3) y factores de transcripción forkhead (FK). Véase Brazil y Hemmings, *Trends in Biochemical Sciences* 26, 675-664.

Varias proteína quinasas y fosfatasa regulan la actividad de la AKT. Por ejemplo, la activación de AKT está mediada por la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K), que genera fosfolípidos como segundo mensajero que entonces se unen al dominio de unión de homología a pleckstrina (PH) de AKT. La unión atrae la AKT a la membrana plasmática en la que la AKT se fosforila mediante quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol (PDK1) en Thr308, lo que entonces provoca la fosforilación de AKT en Ser473 y la activación de la enzima. Las amplificaciones de la subunidad catalítica de PI3-K, p110 α , o mutaciones en la subunidad reguladora de PI3-K, p85 α conducen a la activación de AKT en varios tipos de cáncer humano. (Vivanco y Sawyers, *Nature Reviews in Cancer* (2002) 2: 489-501).

El supresor tumoral, PTEN, es un regulador negativo crítico de la activación de AKT mediante PI3-K (Myers *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95, EE.UU. (1998) 13513-13518). Las mutaciones de inactivación en el gen *Pten* se han encontrado a altas frecuencias en un gran número de tumores humanos y líneas celulares tumorales, incluyendo el cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, glioblastoma, melanoma y otros tipos de cáncer. La inactivación de la proteína PTEN da como resultado niveles elevados de la actividad de AKT aumentada y AKT fosforilada en células tumorales (Li, *et al.*, *Science* (1997) 275: 1943-1947; Guldberg, *et al.*, *Cancer Research* (1997) 57: 3660-3663; Risinger, *et al.*, *Cancer Research* (1997) 57: 4736-4738; Vivanco y Sawyers, *Nature Reviews in Cancer* (2002) 2: 489-501). Además de la sobreactivación de AKT debido a defectos en PTEN, se ha encontrado amplificación directa y/o sobreexpresión de AKT-2 y AKT-3 en neoplasia humana, por ejemplo células de cáncer de mama, de próstata, de páncreas y de ovario (Cheung *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* (1992) 89: 9267-9271; Cheung *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* (1996) 93: 3636-3641; Nakatani *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1999) 274: 21528-21532).

El papel crítico de AKT en la supervivencia y proliferación celular se refuerza además mediante estudios que muestran que la inactivación de la línea germinal de AKT-1 da como resultado la letalidad embrionaria parcial. Las crías supervivientes presentan un crecimiento atrofiado, aumento de la apoptosis de organismo y muertes prematuras. (Cho *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 38349-38520; Chen *et al.*, *Genes Dev.* (2001) 15: 2203-2208). También se ha demostrado que la inactivación farmacológica de AKT induce la apoptosis en células cáncer de ovario humanas cultivadas (Yuan *et al.*, *Oncogene* 19, 2324-2340, 2000) y disminuye el crecimiento de un xenoinjerto de carcinoma de ovario humano en ratones (Hu *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 6, 880-886, 2000).

Estudios recientes también han demostrado el papel de la ruta PI3-K/AKT en el ciclo de vida de numerosos virus. Algunas proteínas virales han mostrado que activan directamente la ruta PI3-K/AKT, proporcionando así un entorno favorable para la replicación viral. Éstas incluyen la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humano (VIH), proteína X del virus de la hepatitis B, y NS5A del virus de la hepatitis C (Borgatti *et al.*, *Eur. J. Immunol.* (1997) 27: 2805-2811; Lee *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 16969-16977; He *et al.*, *J. Virol.* (2002) 76: 9207-9217). También se requiere la ruta PI3-K/AKT para la iniciación y finalización del ciclo de replicación del citomegalovirus humano (CMVH). De hecho, la inactivación farmacológica de esta ruta da como resultado la producción abortiva de CMVH y la supervivencia de las células huésped (Johnson *et al.*, *J. Virol.* (2001) 75: 6022-6032).

Debido a su papel fundamental en la regulación de la supervivencia celular, la ruta PI3 quinasa/AKT proporciona una diana terapéutica novedosa para el tratamiento eficaz de diversos trastornos, particularmente cáncer e infecciones virales. Sin embargo, tal tratamiento requiere el desarrollo de inhibidores selectivos, potentes de quinasas dentro de esta ruta. La presente invención proporciona métodos de uso de bisindolilmaleimidias conocidas dadas a conocer previamente como inhibidores selectivos de proteína quinasa C beta-1 y proteína quinasa C beta-2 (véase entre otros el documento WO 01/30331). Específicamente, se esperaría que la inhibición de PDK-1 mediante estos compuestos suprima la activación de la ruta completa ya que PDK-1 es la quinasa clave que activa la AKT. La inhibición de p70S6 quinasa, una quinasa efectora en el sentido de 3' de AKT, suprimiría además la biogénesis potenciada de ribosomas y la traducción de proteínas provocada mediante la activación de la ruta AKT.

El adenocarcinoma de próstata (ACP) es el tumor maligno no cutáneo, más común y la segunda causa de muerte por cáncer en hombres. La enfermedad tiene dos fases distintas: la fase dependiente de andrógenos, que puede tratarse eficazmente con terapias de ablación de andrógenos, y la fase independiente de andrógenos. Se estima que más de treinta mil hombres morirán cada año de ACP metastásico independiente de andrógenos. Los esfuerzos para entender

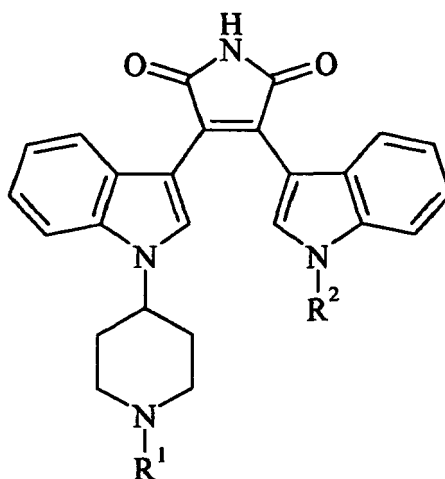
la progresión metastásica de la progresión del ACP a enfermedad metastásica, independiente de andrógenos, implica una respuesta apoptótica reducida, una liberación del bloqueo del ciclo celular que sigue inicialmente la retirada de andrógenos y un cambio de la dependencia de los factores de supervivencia y crecimiento derivados de paracrina a la producción autónoma de estas proteínas clave. La pérdida funcional de la fosfatasa supresora de tumores y del homólogo de tensina suprimida en el cromosoma diez (PTEN) y la posterior activación de la ruta AKT, se han implicado de forma destacada en la progresión del ACP a la independencia de andrógenos.

La activación de la ruta AKT puede suprimir la respuesta apoptótica, debilitar el control del ciclo celular e intensificar selectivamente la producción de factores de supervivencia y crecimiento clave. Aunque muchas proteínas y rutas de señalización intracelular pueden influenciar estas respuestas biológicas, la activación de la ruta AKT es una señal particularmente potente implicada en la progresión del ACP a la independencia de andrógenos y por tanto proporciona una terapia de ACP independiente de andrógenos avanzada (Graff 2002). El tratamiento de células de cáncer de próstata CWR22Rv1, LNCaP y Du145 con el compuesto induce la apoptosis.

Rokhlin *et al.* J. Biol. Chemistry 2002, 277, 36, 33213-33219 notifica que un compuesto de bisindolilmaleimida específico Bis IX podía inhibir la transcripción en la muerte celular mediada por la familia del receptor TNF. Según se informa, Bis IX puede potenciar la muerte celular cuando se usa en combinación con un agente de inducción de apoptosis tal como TNF- α , anticuerpo monoclonal anti-Fas agonista y ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) induciendo actividad caspasa. Según se informa Bis IX solo no puede inducir actividad caspasa. Rokhlin *et al.* concluía que tal terapia de combinación con agentes que inducen apoptosis tales como TRAIL pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer de próstata independiente de andrógenos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula



(I)

en la que R¹ y R² son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₄; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer de próstata.

En una segunda realización, la invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para tratar el adenocarcinoma de próstata independiente de andrógenos.

En una tercera realización, la invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento para tratar un glioblastoma, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de endometrio o cáncer de células renales.

Descripción detallada de la invención

Los términos generales usados en la descripción de los compuestos descritos en el presente documento tienen sus significados habituales. Por ejemplo, la expresión “alquilo C₁-C₄” se refiere a cadenas alifáticas saturadas, monovalentes, lineales o ramificadas, de 1 átomo de carbono a 4 átomos de carbono e incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo.

Los compuestos preferidos de esta invención incluyen compuestos de fórmula I en la que R¹ es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo o isopropilo. Otros compuestos preferidos incluyen aquéllos en los que R² es hidrógeno o metilo. Los

compuestos más preferidos son aquéllos en los que R¹ es hidrógeno. El experto apreciará que pueden seleccionarse realizaciones preferidas adicionales combinando las anteriores realizaciones preferidas, o por referencia a los ejemplos dados en el presente documento.

La expresión “sal farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sal de un compuesto de la fórmula (I) anterior. Debe reconocerse que el contraíón particular que forma una parte de cualquier sal de esta invención normalmente no es de naturaleza crítica, siempre que la sal como un todo sea farmacológicamente aceptable y siempre que el contraíón no aporte cualidades no deseadas a la sal como un todo.

Los compuestos de fórmula (I) descritos en el presente documento forman sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables con una amplia variedad de ácidos orgánicos e inorgánicos e incluyen las sales fisiológicamente aceptables que se usan a menudo en química farmacéutica. Tales sales también son parte de esta invención. Una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable se forma a partir de un ácido farmacéuticamente aceptable, tal como se conoce bien en la técnica. Tales sales incluyen las sales farmacéuticamente aceptables enumeradas en *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2-19 (1977), que el experto conoce. Véase también, *The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use*. P. H. Stahl y C. G. Wermuth (ED.s), Verlag, Zurich (Suiza) 2002.

Los ácidos inorgánicos típicos usados para formar tales sales incluyen clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, fosfórico, hipofosfórico, metafosfórico, pirofosfórico y similares. También pueden usarse sales derivadas de ácidos orgánicos, tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos e hidroxialcandioicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos aromáticos y alifáticos. Por tanto tales sales farmacéuticamente aceptables incluyen acetato, fenilacetato, trifluoroacetato, acrilato, ascorbato, benzoato, clorobenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, metilbenzoato, o-acetoxibenzoato, naftalen-2-benzoato, bromuro, isobutirato, fenilbutirato, α -hidroxibutirato, butino-1,4-dicarboxilato, hexino-1,4-dicarboxilato, caprato, caprilato, cinamato, citrato, formiato, fumarato, glicolato, heptanoato, hipurato, lactato, malato, maleato, hidroximaleato, malonato, mandelato, mesilato, nicotinato, isonicotinato, nitrato, oxalato, ftalato, tereftalato, propiolato, propionato, fenilpropionato, salicilato, sebacato, succinato, suberato, bencensulfonato, p-bromobencensulfonato, clorobencensulfonato, etilsulfonato, 2-hidroxietilsulfonato, metilsulfonato, naftalen-1-sulfonato, naftalen-2-sulfonato, naftalen-1,5-sulfonato, p-toluensulfonato, xilensulfonato, tartarato y similares.

Los compuestos de fórmula (I) se describen en Heath, Jr. *et al.*, patente estadounidense n° 5.668.152. La síntesis de los compuestos de fórmula (I) se expone completamente así como una descripción de que dichos compuestos son útiles como inhibidores de proteína quinasa C (PKC) selectivos de isozimas beta-1 y beta-2. Como inhibidores de PKC selectivos de isozimas, los compuestos se han dado a conocer previamente como útiles en el tratamiento de afecciones asociadas a diabetes mellitus y sus complicaciones así como isquemia, inflamación, trastornos del sistema nervioso central, enfermedad cardiovascular, enfermedad dermatológica, enfermedad de Alzheimer y cáncer.

Mientras que la patente estadounidense n° 5.668.152 describe el tratamiento del cáncer usando inhibidores selectivos de PKC beta-1 y beta-2, de los que se incluyen de manera genérica los presentes compuestos de fórmula (I), no se enseña ni se sugiere que los compuestos de fórmula (I) son inhibidores de la ruta PI3K/AKT. Debido a que la ruta AKT actúa como un regulador central de la respuesta apoptótica, se esperaría que los inhibidores de esta ruta indujeran apoptosis y/o bloquearan la progresión del ciclo celular mientras que no se esperaría que la inhibición de PKC, que tiene muchos papeles dispares en la célula, necesariamente hiciera eso.

Tal como se usa en el presente documento, el término “paciente” se refiere a un mamífero o animal de sangre caliente que necesita tratamiento para, o con riesgo de desarrollar, una o más enfermedades o trastornos asociados a la actividad de la ruta AKT (por ejemplo actividad PDK-1/p70S6 quinasa). Se entiende que las cobayas, perros, gatos, ratas, ratones, hámsters y primates, incluyendo seres humanos, son ejemplos de pacientes dentro del alcance del significado del término. Los pacientes preferidos incluyen seres humanos.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse solos o en forma de una composición farmacéutica, esto es, combinados con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, la proporción y naturaleza de los cuales se determinan mediante la solubilidad y las propiedades químicas del compuesto seleccionado, la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica convencional. Los compuestos de la presente invención, aunque son eficaces por sí mismos, pueden formularse y administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, para fines de estabilidad, conveniencia de cristalización, solubilidad aumentada y similares.

Por tanto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I) y un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de fórmula (I) pueden administrarse mediante una variedad de vías. Efectuando el tratamiento de un paciente aquejado con o con riesgo de desarrollar los trastornos descritos en el presente documento, puede administrarse un compuesto de fórmula (I) en cualquier forma o modo que haga al compuesto biodisponible en una cantidad eficaz, incluyendo las vías oral y parenteral. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (I) pueden administrarse por vía oral, mediante inhalación o mediante las vías subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, intranasal, rectal, ocular, tópica, sublingual, bucal u otras. Generalmente se prefiere la administración oral para el tratamiento de los trastornos descritos en el presente documento. Sin embargo, la administración oral no es la única vía preferida. Por ejemplo, puede preferirse la vía intravenosa por conveniencia o para evitar posibles complicaciones relacionadas con

la administración oral. Cuando se administra el compuesto de fórmula (I) a través de la vía intravenosa, se prefiere una inyección en bolo intravenosa o infusión lenta.

Un experto en la técnica de preparar formulaciones puede seleccionar rápidamente la forma y el modo de administración apropiados dependiendo de las características particulares del compuesto seleccionado, el trastorno o afección a tratar, la fase del trastorno o la afección, y otras circunstancias relevantes. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Co. (1990)).

Las composiciones farmacéuticas se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica. El vehículo o excipiente puede ser un material sólido, semi-sólido o líquido que puede servir como un vehículo o medio para el principio activo. Se conocen bien en la técnica vehículos o excipientes adecuados. La composición farmacéutica puede adaptarse para uso oral, por inhalación, parenteral o tópico y puede administrarse al paciente en forma de comprimidos, cápsulas, aerosoles, inhaladores, supositorios, soluciones, suspensiones o similares.

Para el fin de la administración oral terapéutica, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, chicles y similares. Estas preparaciones deben contener al menos el 4% del compuesto de la presente invención, el principio activo, pero pueden variarse dependiendo de la forma particular y puede ser convenientemente de entre el 4% y aproximadamente el 70% del peso de la unidad. La cantidad del compuesto presente en las composiciones es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Un experto en la técnica puede determinar las composiciones y preparaciones preferidas según la presente invención.

Los comprimidos, pastillas, cápsulas, trociscos y similares también pueden contener uno o más de los siguientes adyuvantes: aglutinantes tales como povidona, hidroxipropilcelulosa, celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio, almidón o lactosa; agentes de disgregación tales como ácido algínico, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como talco, aceite vegetal hidrogenado, estearato de magnesio o Sterotex; deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; y agentes edulcorantes, tales como sacarosa, aspartamo o sacarina, o un agente aromatizante, tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja, pueden añadirse. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol o un aceite graso. Otras formas unitarias de dosificación pueden contener otros materiales diversos que modifican la forma física de la forma unitaria, por ejemplo, revestimientos. Por tanto, los comprimidos o pastillas pueden revestirse con azúcar, goma laca u otros agentes de revestimiento. Los jarabes pueden contener, además de los presentes compuestos, sacarosa como agente edulcorante y ciertos conservantes, tintes y colorantes y aromas. Los materiales usados en la preparación de estas diversas composiciones deben ser farmacéuticamente puros y no tóxicos en las cantidades usadas.

Los compuestos de fórmula (I) son inhibidores de PDK1 y p70S6 quinasa, dos miembros de la ruta PI3 quinasa/AKT. Puede demostrarse la actividad inhibidora de los compuestos de fórmula (I) mediante los métodos a continuación.

Ensayos de actividad quinasa

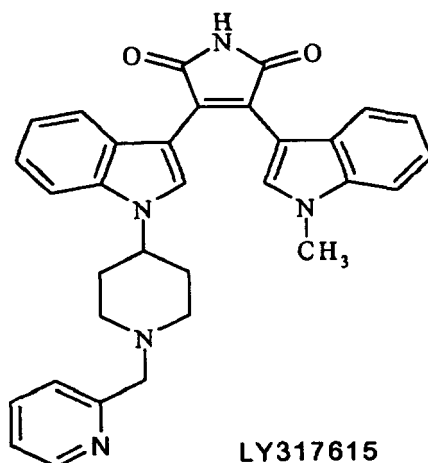
El ensayo descrito mide la fosforilación del péptido PDKtide (KTFCGTPEYLAPEVRREPRILSEEEQEMFRDFD-YIADWC; n° de cat. 14-452, lote 23876U) en el sitio consenso de fosforilación de PDK1 mediante PDK-1 recombinante (UBI) en Km para la saturación de ATP y PDKtide usando placas filtrantes de membrana de fosfocelulosa. También se mide de manera similar la fosforilación del sustrato de p70S6 quinasa mediante p70S6 quinasa recombinante.

Cultivo celular, tratamiento farmacológico, ensayos de apoptosis y proliferación

Se obtuvieron ambas líneas tumorales, de carcinoma de colon HCT116 (n° de cat. CCL-247) y glioblastoma U87MG (n° de cat. HTB-14), a partir de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC, *American Type Culture Collection*). El medio de crecimiento convencional difería para cada línea celular pero se hicieron crecer todas en FBS inactivado por calor al 10% (Invitrogen n° de cat. 10082-147), 37°C, atmósfera de CO₂ al 5% y en una cámara humidificada. Se completó el paso celular de una a dos veces por semana usando disolución de tripsina al 0,25%/EDTA 1 mM (Invitrogen, n° de cat. 25200-056) manteniendo las células en crecimiento de fase log. Se cultivaron células U87MG en medio DMEM (Invitrogen n° de cat. 11965-092), aminoácidos no esenciales 1 mM (AANE) y piruvato de sodio 0,1 mM. Se hicieron crecer células HCT116 en medio modificado McCoy 5A (Invitrogen, n° de cat. 16600-082), bicarbonato de sodio al 0,15%, HEPES 0,1 mM, D-glucosa 25 mM y piruvato de sodio 0,1 mM.

Se ejecutaron ensayos de apoptosis usando el kit de ensayo de detección de muerte celular ELISA^{plus} (Roche, 1774425) siguiendo estrictamente el protocolo adjunto.

Se evaluaron los cambios en la proliferación celular resultante del tratamiento con LY317615 (véase por ejemplo el documento WO 02/02116), que es un compuesto de fórmula



5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

o un compuesto de fórmula (I) en la que R¹ es hidrógeno y R² es metilo (compuesto 1) mediante la incorporación de yoduro de propidio (PI) (Sigma, n° de cat. p-4864). Brevemente, se centrifugó cada placa de cultivo celular 10 minutos (200 rpm), se aspiró cuidadosamente el sobrenadante y se añadieron 100 μ l de PI 0,125 mM en PBS a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se midió la intensidad de fluorescencia de cada pocillo en el cultivo (células no viables) usando el lector de placas multicanal Vector² (Wallac, modelo n° 1420) y se congeló hasta -80°C. Se dejó descongelar la placa, volver a temperatura ambiente y reanalizarse para determinar los cambios en la intensidad de fluorescencia (células totales) usando de nuevo el Vector². Se determinaron las células proliferantes en el cultivo restando la fracción no viable de las células totales. Entonces se notificaron los resultados como un porcentaje del control no tratado.

Se prepararon lisados de proteínas mediante la incubación en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,25%, fluoruro de sodio 1 mM, ortovanadato de sodio 1mM e inhibidores de proteasas CompleteTM (Roche n° de cat. 10019600) durante una hora con rotación. Entonces se centrifugó el lisado (10 minutos a 10.000 rpm), se recogió el sobrenadante y se determinaron las concentraciones de proteína usando el ensayo de proteínas Bio-Rad DC (n° de cat. 500-0122). Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE usando geles de tris-glicina al 4-20% (Invitrogen, n° de cat. EC6028) y se transfirieron a la membrana de PVDF HyperTM-bond (Amersham, n° de cat. rpn303F). Se incubaron todos los anticuerpos primarios durante la noche a 4°C en una disolución de leche al 5%/1X PBS (Gibco, n° de cat. 70011-044). Se incubaron anticuerpos secundarios (Santa Cruz, n° de cat. sc-2055, sc-2054) unidos a peroxidadas del rábano (HRP) durante un mínimo de dos horas antes de la detección. Se determinó la señal específica mediante el programa Lumi-ImagerTM y Lumi-Analyst para definir cambios en la fosforilación y expresión de proteínas. Los anticuerpos primarios usados son los siguientes: GSK3b, pGSK3b^{ser9} (Cell Signaling, n° de cat. 9332, 9336), proteína ribosómica S6, proteína^{ser240/244} ribosómica pS6 (Cell Signaling, n° de cat. 2212, 2215), AKT (Transduction Labs n° de cat. 610861), pAKT^{ser308}, pAKT^{ser473} (Cell Signaling, n° de cat. 9275, 9271), PHASi (Zymed, n° de cat. 51-2900), p4EBP1^{ser65} (Cell Signaling n° de cat. 9451), p70S6 quinasa, phosph70S6 quinasa^{thr421/ser424} (Cell Signaling n° de cat. 9202, 9204), p90RSK, phosph90RSK^{thr359/ser363} (Cell Signaling n° de cat. 9347, 9344), FKHRL1, pFKHRL^{thr32} (Upstate Biochemicals, Inc. n° de cat. 06-951, 06952).

Protocolo experimental para estudios de inhibición tumoral in vivo

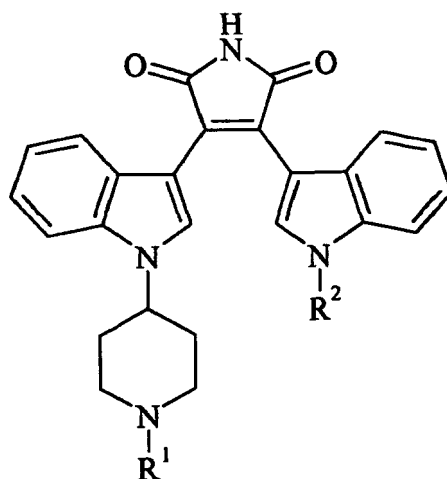
Se implantan de manera subcutánea aproximadamente 5 x 10⁶ células tumorales en el costado de ratones atímicos desnudos (Harlan, Indianápolis, IN). El tratamiento de tumores comienza cuando los tumores alcanzan los 100 mm³ y continúa durante 21 días consecutivos dos veces por día v.o. Se controlan el peso corporal y el tamaño tumoral semanalmente o dos veces por semana.

Resultados

El compuesto 1 inhibe la PDK-1 con una CE50 de 370 nM e inhibe la p70S6 quinasa con una CE50 <500 nM. El tratamiento con compuesto 1 induce la apoptosis en líneas celulares de cáncer en seres humanos derivadas de colon, pulmón y próstata (ambas líneas tumorales, dependientes e independientes de andrógenos) así como de linfoma no de Hodgkin. El tratamiento con compuesto 1 suprime la fosforilación de GSK3 β , el factor de transcripción forkhead AFX, 4EBP1, y proteína ribosómica S6 (todas las lecturas de actividad de la ruta AKT). Además, el tratamiento de ratones portadores de xenoinjertos de tumor humano con compuesto 1 suprime la fosforilación de GSK3 β ^{ser9} en estos tejidos de xenoinjerto, incluyendo una línea celular de carcinoma de próstata independiente de andrógenos, durante hasta 8 horas tras la dosificación. Se ha demostrado la eficacia antitumoral del compuesto tanto en xenoinjertos de cáncer de colon HCT116, en xenoinjertos de glioblastoma U87MG como en xenoinjertos a partir de la línea celular PC3 de carcinoma de próstata independiente de andrógenos.

REIVINDICACIONES

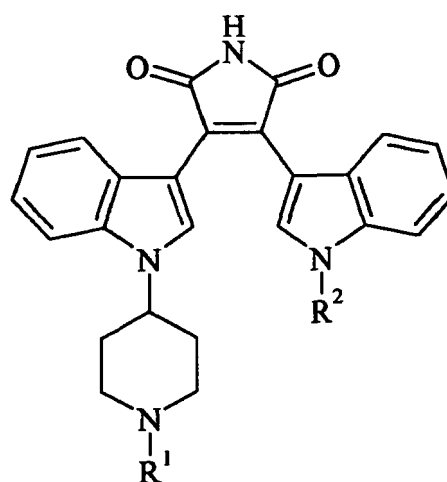
1. El uso de un compuesto de fórmula



(I)

en la que R^1 y R^2 son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_4 ; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer de próstata.

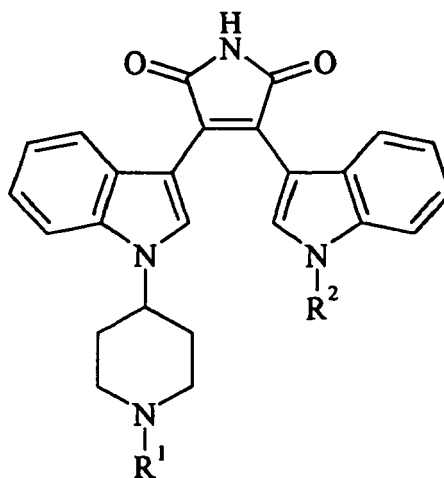
2. El uso de un compuesto de fórmula



(I)

en la que R^1 y R^2 son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_4 ; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para tratar el adenocarcinoma de próstata independiente de andrógenos.

3. El uso de un compuesto de fórmula



(I)

en la que R¹ y R² son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₄; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la preparación de un medicamento para tratar el glioblastoma, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de endometrio o cáncer de células renales.

4. El uso según la reivindicación 3, en el que dicho medicamento es para tratar el glioblastoma.

5. El uso según la reivindicación 3, en el que dicho medicamento es para tratar el cáncer de colon.

6. El uso según la reivindicación 3, en el que dicho medicamento es para tratar el cáncer de páncreas.

7. El uso según la reivindicación 3, en el que dicho medicamento es para tratar el cáncer de ovario.

8. El uso según la reivindicación 3, en el que dicho medicamento es para tratar el cáncer de endometrio.

9. El uso según la reivindicación 3, en el que dicho medicamento es para tratar el cáncer de células renales.

10. El uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que R² es hidrógeno o metilo.

11. El uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que R¹ es hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo o isopropilo.

12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que R¹ es hidrógeno y R² es metilo.