



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 347 739**

(51) Int. Cl.:

C07C 63/04 (2006.01)

C07C 63/33 (2006.01)

C07C 63/36 (2006.01)

C07C 229/44 (2006.01)

A61K 31/195 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99916424 .7**

(96) Fecha de presentación : **06.04.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1091924**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2001**

(54) Título: **Nuevos retinoides y su uso.**

(30) Prioridad: **06.04.1998 US 80868 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.11.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.11.2010

(73) Titular/es: **The UAB Research Foundation
Suite 1120G-AB, 701 South 20th Street
Birmingham, Alabama 35294-0111, US**

(72) Inventor/es: **Brouillette, Wayne, J. y
Muccio, Donald, D.**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Nuevos retinoides y su uso.

5 Fundamentos de la invención

Inscripción de fondos federales

Esta invención se realizó en parte usando fondos suministrados por el gobierno de los EE.UU. con la subvención PO1 CA34968. Por consiguiente, el gobierno de los EE.UU. tiene ciertos derechos en esta invención.

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a los campos de la química y el tratamiento del cáncer. Más específicamente, la presente invención se refiere a nuevos retinoides y su uso en la quimioprevención y tratamiento del cáncer.

Descripción de la técnica relacionada

En las descripciones químicas que siguen, se puede considerar que *E* es sinónimo de *trans* y *Z* se puede considerar sinónimo de *cis*. Los receptores retinoides y otros miembros de esta superfamilia de receptores nucleares (que incluyen los receptores de hormonas esteroideas, tiroideas y de vitamina D y otros receptores "huérfanos" sin ligandos conocidos) son nuevos objetivos para el desarrollo de fármacos (1). Se cree que el ácido retinoico (AR) y los retinoides sintéticos actúan como factores de transcripción dependientes de ligandos con diferentes miembros de receptores de retinoides nucleares para controlar la transcripción génica responsable de la proliferación celular, diferenciación, desarrollo y muerte celular (2). Hasta ahora se han identificado dos clases de receptores retinoides nucleares (los RAR y los RXR) y cada uno presenta diversos subtipos diferentes (α , β , γ). Tanto (*todos E*)- como (9Z)-AR se unen a los RAR y activan la transcripción mediada por heterodímeros RAR/RXR, pero (9Z)-AR es el único ligando natural conocido para los RXR que median la transcripción mediante la formación de homodímeros o heterodímeros.

Los recientes avances en la quimioprevención han aumentado el interés por el uso de retinoides en diversos tipos de tumores de órganos sólidos y se han demostrado mayores éxitos terapéuticos con retinoides en ciertas leucemias (3). El tratamiento con (*todos E*)-AR de pacientes con leucemia promielocítica aguda (APL, por sus siglas en inglés) conduce a un índice de remisión completa del 90% en estos pacientes por inducción de maduración normal y apoptosis de mieloblastos APL a neutrófilos, pero este tratamiento de diferenciación es transitorio y es seguido comúnmente por recaída dentro de los 3-15 meses, probablemente debido al desarrollo de resistencia al ácido retinoico (4). El (13Z)-AR controla eficazmente la excesiva mieloproliferación en hasta el 50% de los niños con leucemia mielomonocítica juvenil (JMML, por sus siglas en inglés) (5). Sin embargo, este tratamiento no es curativo y a lo sumo puede conducir a un periodo de estabilización prolongada de la enfermedad pero los pacientes por último necesitan experimentar trasplante alogénico de médula ósea (4, 6).

El ácido retinoico todo-trans (ATRA, por sus siglas en inglés) es el primer ejemplo de un agente homologado por la FDA usado para tratamiento de diferenciación (más bien que la quimioterapia citotóxica clásica del cáncer) de pacientes con APL. Incluso aunque se ha demostrado que es muy eficaz en el tratamiento de APL, la resistencia clínica con frecuencia tiene lugar con dosis farmacológicas de ATRA y los pacientes de APL con frecuencia sufren una recaída (Degos *et al.*, 1.995, *Blood*, 85, 2.643). Para proporcionar tratamientos más eficaces, se requiere identificar nuevos retinoides altamente activos con la esperanza de que dosis inferiores de estos agentes no induzcan la recaída tan rápidamente como ATRA.

Los compuestos retinoides acetato de retinilo, *N*-(4-hidroxifenil)retinamida, retinilideno dimedona, *N*-etilretinamida y *N*-benzoinretinilamina demostraron actividad como inhibidores de transformación neoplásica inducida por metilcolantreno en líneas celulares de fibroblastos *in vitro* (Bertram, JS, 1.980, *Cancer Research* 40, 3.141-3.146). En un modelo de ratas la *todo(E)* *N*-(4-hidroxifenil)retinamida demostró un efecto preventivo contra el cáncer de mama (Moon, *et al.*, 1.979, *Cancer Research* 39, 1.339-1.346).

- Se han sintetizado homólogos de retinoides 9(Z) y *todo(E)* que están sustituidos en el anillo de ciclohexenilo de ácido retinoico en el C5-C6 con sustituyentes alquílicos o como combinados como sustituyentes cicloalquílicos o cicloalquenílicos imitan el volumen estérico del resto trimetilciclohexilo de retinoides sin pérdida de actividad efectiva. Los compuestos particulares se sustituyen con hidrógeno, restos metilo, etilo y/o isopropilo (Muccio *et al.*, 1.996, *J. Med. Chem.* 39, 3.625-3.635; Alan *et al.*, 1.995, *J. Med. Chem.* 38, 2.302-2.310 y Vaezi *et al.*, 1.994, *J. Med. Chem.* 37, 4.499-4.507). La patente de EE.UU. A-5.094.783 describe homólogos de retinoides adicionales donde los sustituyentes C5-C6 pueden ser alcoxi o formar un resto cicloalquilo o cicloalquenilo.

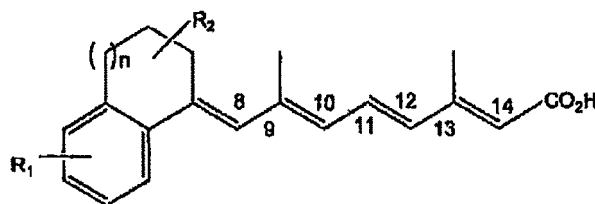
La línea celular NB4, que se aisló de un paciente APL que experimenta tratamiento con ATRA ofrece un excelente modelo *in vitro* de APL. La traslocación t(15, 17), que es característica de APL, se realiza de manera estable en células NB4 y la proteína de fusión PML/RAR-a se expresa en esta línea celular transformada (Lanotte *et al.*, 1.991, *Blood*, 77: 1.080). El tratamiento con ATRA de las células NB4 retira el bloque PML/RAR-a para la diferenciación y permite que los promielocitos maduren normalmente y mueran. El mecanismo por el que el ATRA retira el bloque de

diferenciación no se entiende bien. Las pruebas recientes sugieren que el ATRA regula hacia la baja la expresión de PML/RAR- α y restablece la diferenciación mieloide normal (Raelson *et al.*, 1.996, *Blood*, 88, 2.826).

La técnica anterior es deficiente en agente terapéuticos eficaces con los efectos beneficiosos del ácido retinoico pero que presentan efectos secundarios reducidos. La presente invención satisface esta antigua necesidad y deseo en la técnica.

Sumario de la invención

Según una realización, la presente invención se refiere a un compuesto retinoide que es un isómero 9(Z) o un todo (E) de una estructura que comprende:



en la que R_1 es fenilo, bencilo, alquilo cíclico C_3 - C_8 , arilo o arilalquilo;

R_2 es hidrógeno, etilo, metilo, n-propilo o iso-propilo y n es de 0 a 3.

Se proporciona un nuevo retinoide, UAB30, cuyo isómero *todo-E* presenta diferente selectividad de los receptores nucleares (retinoide selectivo de subtipo RAR β y RAR γ y antagonista de RAR α) que (*todo-E*)-UAB8.

La presente invención también evalúa nuevos retinoides restringidos de manera conformacional, denominados retinoides UAB, en ensayos de diferenciación de células NB4 y se identificó *todo-trans*-UAB8 con más potencia que ATRA (Muccio *et al.*, 1.998, *J. Med. Chem.* 41, 1.679). Para evaluar además su potencial en el tratamiento de APL, se estudió su capacidad para inducir diferenciación de células NB4 en presencia de retinoides selectivos de RXR, que se ha demostrado que mejoran la eficacia de ATRA (Chen *et al.*, 1.996, *Nature*, 382, 819). Además, se identificaron y se usaron retinoides UAB que disocian la trans-activación de RAR- α y las acciones de trans-represión de ATRA para entender los mecanismos mediados por RAR de *todo-trans*-UAB8 en diferenciación de células NB4.

En una realización de la presente invención, se proporcionan compuestos para una nueva clase estructural de retinoides, en la que los compuestos son UAB30 y análogos. Ejemplos representativos son (9Z)-UAB30, (9Z)-UAB31, (9Z)-UAB32, (9Z)-UAB33, (todo E)-UAB33, (9Z)-UAB34, (9Z)-UAB35 y (9Z)-UAB40.

En otra realización más de la presente invención, se proporciona un uso de los nuevos compuestos retinoides como medicamento en una dosis eficaz para tratar a un individuo con necesidad de tal tratamiento. Preferiblemente, el individuo necesita tratamiento para leucemia o necesita quimioprevención del cáncer. Los compuestos retinoides se pueden usar de manera sinérgica para el tratamiento.

Otros y más aspectos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas en el momento presente de la invención dadas para los fines de descripción.

Breve descripción de los dibujos

A fin de que la materia en que las características, ventajas y objetos ya mencionados de la invención, así como otros que serán evidentes, se consigan y se puedan entender con detalle, las descripciones más particulares de la invención resumidas brevemente anteriormente pueden tener como referencia ciertas realizaciones de las mismas que se ilustran en los dibujos adjuntos. Estos dibujos forman parte de la memoria descriptiva. Se debe observar que, sin embargo, los dibujos adjuntos ilustran realizaciones preferidas de la invención y por lo tanto no deben considerarse limitantes de su alcance.

La Figura 1 muestra estructuras I y II generales que describen UAB8 y análogos (UAB8 se define como R_1 = etilo y R_2 = isopropilo en la estructura I), en la que R_1 se selecciona del grupo que consiste en: H, etilo, metilo, n-propilo, isopropilo, terc-butilo, fenilo, bencilo, alquilo cíclico (de C_3 - C_8), arilo y arilalquilo y R_2 se selecciona del grupo que consiste en 2-metilpropilo, n-butilo, ciclohexilo, 3-ciclohexenilo, bencilo, alquilo cíclico (de C_3 - C_8) y arilalquilo. Y en la que R_1 se selecciona del grupo que consiste en fenilo, bencilo, alquilo cíclico (de C_3 - C_8), arilo y arilalquilo y R_2 se selecciona del grupo que consiste en: H, etilo, metilo, n-propilo, e isopropilo.

La Figura 2 muestra estructuras generales III y IV que describen UAB30 y análogos, en las que R_1 representa uno o dos sustituyentes en el anillo arílico y se selecciona del grupo que consiste en: H, etilo, metilo, n-propilo, isopro-

pilo, terc-butilo, fenilo, bencilo, cloro, fluoro, metoxi, etoxi, benciloxi, alquilo cíclico (de C1-C8), arilo, arilalquilo, alquiloxi, ariloxi, arilalquiloxi y halógeno; R₂ se selecciona del grupo que consiste en: H, etilo, metilo, n-propilo, isopropilo, 2-metilpropilo, n-butilo, ciclohexilo, 3-ciclohexenilo, bencilo, metoxi, etoxi, benciloxi, alquilo cíclico (de C1-C8), arilo, arilalquilo, alquiloxi, ariloxi y arilalquiloxi y en las que n = 0-3.

La Figura 3 muestra el esquema de preparación de UAB30.

La Figura 4 muestra las estructuras de ácido todo-trans-retinoico (ATRA) comparado con los isómeros todo-trans y 9-cis de retinoides UAB8 y UAB30.

La Figura 5 muestra inhibición de la actividad transcripcional de RAR- α inducida por ácido todo-trans-retinoico en células CV-1 por antagonistas de RAR- α , todo-trans-UAB30 y Ro-41-5253. La dosis de ácido todo-trans-retinoico fue de 50 nM y la dosis de todo-trans-UAB30 y Ro-41-5253 se variaron entre 10⁻⁸ y 10⁻⁶ M.

La Figura 6 muestra inhibición de actividad transcripcional de RAR- α inducida por TPA en células HeLa por ácido todo-trans-retinoico (ATRA) e isómeros UAB8 y UAB30 a dos dosis (10⁻⁷ y 10⁻⁶ M).

La Figura 7 muestra diferenciación de células NB4 por ATRA (círculos rellenos), todo-trans-UAB8 (triángulos rellenos), 9-cis-UAB8 (cuadrados rellenos), todo-trans-UAB30 (triángulos rellenos boca abajo) y 9-cis-UAB30 (diamantes rellenos). Se cultivaron células durante 3 días en medio enriquecido con FBS al 10% y la concentración indicada de cada retinoide. Se evaluó la diferenciación como porcentaje de célula NBT positiva.

La Figura 8A muestra la capacidad del ácido todo-trans-retinoico (ATRA) para diferenciar las células NB4 (círculos rellenos) solas o junto con 9-cis-UAB8 (1:2,5) (triángulos rellenos), 9-cis-UAB30 (1:10) (cuadrados rellenos) o todo-trans-UAB30 (1:10) (diamantes rellenos).

La Figura 8B muestra la capacidad de todo-trans-UAB8 para diferenciar células NB4 (círculos rellenos) solas o junto con 9-cis-UAB8 (1:2,5) (triángulos rellenos), 9-cis-UAB30 (1:10) (cuadrados rellenos) o todo-trans-UAB30 (1:10) (diamantes rellenos).

La Figura 9 muestra la capacidad de todo-trans-UAB8 para diferenciar las células NB4 (círculos rellenos) solas o junto con 4-hidroxifenilretinamida a 1 μ M (triángulos rellenos) y 4 μ M (cuadrados rellenos).

La Figura 10 muestra el peso de tumor de mama promedio/rata (gramos) durante un periodo de tiempo post-inducción de metilnitrosourea (MNU). Se trataron ratas del grupo 17 con Vehículo (dieta Teklad) (círculos), mientras el Grupo 29 con UAB30 (dieta de 200 mg/kg) (cuadrados rellenos).

La Figura 11 muestra el peso corporal promedio /rata (gramos) en diferentes días de edad. Las ratas del Grupo 17 se trataron con Vehículo (dieta Teklad) (círculos), mientras el Grupo 29 con UAB30 (dieta de 200 mg/kg) (cuadrados rellenos).

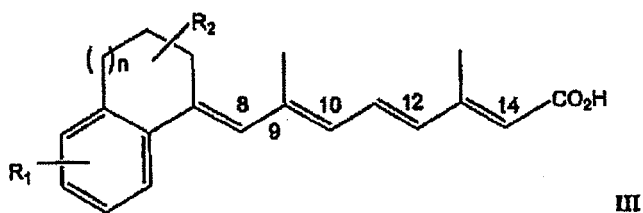
Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige a nuevos compuestos retinoides y sus usos.

El ácido todo-trans-retinoico (ATRA) induce que la línea celular de leucemia promielocítica aguda (APL), NB4, diferencie de manera terminal a granulocitos. Clínicamente, se usa ATRA como tratamiento alternativo para pacientes de APL que llegan a ser refractivos a la quimioterapia citotóxica normal. Sin embargo, la mayoría de los pacientes APL desarrollan resistencia clínica con el tratamiento prolongado con ATRA. Se identifica todo-trans-UAB8 como agente más eficaz que ATRA en inducir que se diferencien las células NB4. La presente invención también investiga los efectos de todo-trans-UAB8, un retinoide selectivo de RAR, en la diferenciación de células NB4 cuando se usa junto con 9-cis-UAB8 o 9-cis-UAB30, dos retinoides selectivos de RXR. El uso combinado de todo-trans-UAB8 y 9-cis-UAB30 actuó sinérgicamente en la diferenciación de células NB4, mientras 9-cis-UAB30 presentó poco efecto solo. Adicionalmente, todo-trans-UAB8 y 4-hidroxifenilretinamida actúan sinérgicamente para inducir que se diferencien las células NB4.

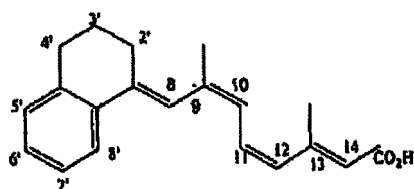
Los mecanismos a base de receptores nucleares potenciales de acción de diferenciación inducida por retinoides en esta línea celular se exploraron a continuación. Se demostró que todo-trans-UAB8 era muy eficaz tanto en la transactivación mediada por RAR de genes como en la trans-represión mediada por RAR del complejo AP-1 (c-Jun/c-Fos). Para distinguir entre estos dos mecanismos a base de receptor, se evaluó todo-trans-UAB30 y fue activo en la trans-represión de complejo AP-1 pero como antagonista de RAR- α . Cuando se usó solo, todo-trans-UAB30 no indujo diferenciación de células NB4 y, cuando se usó en asociación, redujo la eficacia de o todo-trans-UAB8 o ATRA. Estos datos soportan un mecanismo a base de RAR- α de diferenciación inducida por todo-trans-UAB8 de células NB4. Finalmente, se encontró que todo-trans-UAB8 se metabolizaba a la misma velocidad que ATRA, pero que 9-cis-UAB30 era metabólicamente estable durante 5 días. Tomados juntos, la presente invención describe que la eficacia de todo-trans-UAB8 se puede aumentar además cuando se usa junto con ligandos selectivos de RXR metabólicamente estables, proporcionando un nuevo tratamiento de asociación para el tratamiento clínico de APL.

En una realización de la presente invención, se proporcionan compuestos retinoides (que son isómeros 9(Z) o todo(E) de estructura III)



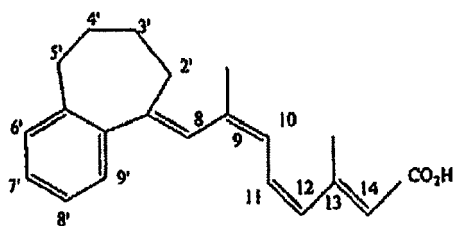
en la que R₁ es fenilo, bencilo, alquilarilo cíclico C₃-C₈ o arilalquilo; R₂ es hidrógeno, etilo, metilo, n-propilo o isopropilo y n = 0-3.

Preferiblemente, los compuestos retinoides UAB30 y análogos se seleccionan del grupo que consiste en (9Z)-UAB30, (9Z)-UAB31, (9Z)-UAB32, (9Z)-UAB33, (todo E)-UAB33, (9Z)-UAB34, (9Z)-UAB35, en que (9Z)-UAB30, (9Z)-UAB31, (9Z)-UAB32, (9Z)-UAB33, (todo E)-UAB33, (9Z)-UAB34 y (9Z)-UAB35 presentan la estructura:



en la que (9Z)-UAB30 tiene un sustituyente H en el anillo arílico; (9Z)-UAB31, tiene un sustituyente 5'-metoxi en el anillo arílico; (9Z)-UAB32, tiene un sustituyente 6'-metoxi en el anillo arílico; (9Z)-UAB33, tiene un sustituyente 7'-metoxi en el anillo arílico; (todo E)-UAB33 tiene un sustituyente 7'-metoxi en el anillo arílico; (9Z)-UAB34 tiene un sustituyente 4'-metilo en el anillo cicloalquílico y (9Z)-UAB35 tiene dos sustituyentes 5', 7'-dimetilo en el anillo arílico.

Más preferiblemente, (9Z)-UAB40 que tiene la estructura:



es un ejemplo representativo de UAB30 y análogos.

En otra realización más, la presente invención se refiere al uso de los compuestos retinoides como medicamento para tratar a un individuo con una afección neoplásica, una dosis eficaz para tratar un neoplásico o neoplásico sospechado o afección similar a neoplásica en un individuo. Preferiblemente, el compuesto retinoide se combina además con 4-hidroxifenilretinamida para el tratamiento. Más preferiblemente, el individuo necesita tratamiento para leucemia o necesita quimioprevención del cáncer, tal como cáncer de piel o de mama. Aún preferiblemente, el compuesto se administra en un intervalo de administración de desde aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg.

En otra realización más de la presente invención, se proporciona un uso de una asociación de dos o más de dos compuestos retinoides descritos en la presente memoria como medicamento eficaz para tratar una afección neoplásica en un individuo. La asociación puede comprender además 4-hidroxifenilretinamida. Aún preferiblemente, el individuo necesita tratamiento para leucemia o necesita quimioprevención del cáncer.

La presente invención también se refiere al uso de una asociación de dos o más de dos compuestos UAB30 o compuestos análogos de UAB30 como medicamento eficaz para tratar una afección neoplásica en un individuo. La asociación puede comprender además 4-hidroxifenilretinamida. Aún preferiblemente, el individuo necesita tratamiento para leucemia o necesidad quimioprevención del cáncer. Las afecciones neoplásicas representativas que se pueden tratar así incluyen cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon y leucemia. Preferiblemente, el compuesto se administra a una dosis de desde aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg. Los siguientes ejemplos se dan con el fin de ilustrar varias realizaciones de la invención y no se desea que limiten la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

Química de Análogos de Ácido Retinoico

Se obtuvieron espectros de RMN de ^1H a 400,1 MHz (espectrómetro Bruker DRX) en CDCl_3 . Se realizaron experimentos NOE de muestras desgasadas usando experimentos NOESY sensibles a la fase 2D con diferentes tiempos de mezcla (entre 250 y 2.000 ms). Típicamente, se usaron tiempos de mezcla de 1 s con 16 pulsos para ciclación de fase y 2 barridos ficticios. Se procesaron los datos con ensanchamiento de línea de 0,3 Hz en cada dimensión y carga cero para proporcionar representaciones gráficas de contorno 2D 512 x 4.096. Las intensidades integradas de los cruces de picos negativos se determinaron usando características de software de RMN Bruker.

Se registraron espectros UV/vis en un espectrofotómetro AVIV 14DS en disoluciones de ciclohexano o metanol (Fisher, Spectrograde). Se registraron espectros IR usando un espectrómetro de FT IR Nicolet en películas delgadas. Se realizaron separaciones HPLC en un sistema de gradiente HPLC Gilson usando cabezas de bomba de 25 ml y un detector de longitud de onda variable ISCO V⁴. La columna empleada fue una Whatman Partisil 10 M20/50 (500 x 22 mm de d. i.) con un caudal de 5 ml/min y se controló por detección UV/vis a 340 nm. Se realizó cromatografía TLC sobre placas de vidrio GF de gel de sílice de 250 μm precubiertas (Analtech, Inc.; 5 x 10 cm). Se destilaron previamente a su uso los disolventes y materiales de partida líquidos. Se realizaron las reacciones y purificaciones con disolventes desoxigenados, bajo gas inerte (N_2) y sometido a iluminación. Los datos seleccionados para los compuestos intermedios y los productos en el esquema mostrado en la Figura 3 se encuentran en la Tabla 1.

Ácido (2Z,4E)-4-(3',4'-Dihidro-1'(2'H)-naftalen-1'-ilideno)-3-metil-2-butanoico ((9Z)-2)

Se agitó polvo de cinc (1,75 g; 26,8 mmoles) con HCl al 5% (5 ml) durante 2 min a temperatura ambiente. Se permitió que la mezcla sedimentara y se retiró cuidadosamente el líquido por pipeta. De una manera similar se lavó el Zn, bajo nitrógeno, con agua (3 x 5 ml), acetona (3 x 5 ml) y éter (2 x 8 ml). Después de que se hubiera retirado el éter residual bajo una corriente de nitrógeno, se calentó fuertemente el matraz que contenía el polvo de Zn con una llama de quemador Bunsen durante 30 s. Se suspendió el polvo de Zn enfriado en dioxano anhidro (3 ml) y se calentó la suspensión agitada para hacerla hervir a reflujo. Se preparó bajo nitrógeno una disolución de α -tetralona recién destilada (0,520 g; 3,56 mmoles), bromosenecionato de etilo (1,47 g; 7,12 mmoles) y dioxano anhidro (2,5 ml) y se añadió una porción de esta disolución (0,5 ml) a la suspensión de Zn calentada. Esto produjo una reacción exotérmica y se añadió después el resto de la disolución que contenía α -tetralona durante 10 min a una velocidad suficiente para controlar el reflujo. Se agitó la mezcla de reacción final a reflujo durante 8 horas y después se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió agua (5 ml), se agitó la mezcla durante 20 min y se añadió éter (20 ml). Se filtró la suspensión por una almohadilla de Celite y se lavó el filtro bien con éter (40 ml). El líquido filtrado se extrajo con HCl al 15% (40 ml), agua (40 ml), NaOH 1 N (40 ml) y una cantidad adicional de agua (30 ml), se combinaron el lavado básico y el lavado final con agua, se ajustó a pH 1-2 con HCl al 15% y se extrajo con éter (2 x 100 ml). Se secó la capa orgánica (Na_2SO_4) y se concentró a vacío a (9Z)-2 como cristales amarillos (0,70 g; rendimiento del 86%); pf 153-154°C (hexano-acetato de etilo 1:1).

(2Z,4E) y (2E,4E)-4-(3',4'-Dihidro-1'(2'H)-naftalen-1'-ilideno)3-metil-2-buten-1-ol ((9Z) y (todo E)-3)

Se dejó enfriar una disolución de ácido (9Z)-2 (0,11 g; 0,48 mmoles) en THF anhidro (10 ml), a -78°C y se añadió gota a gota LiAlH_4 1 M/éter (0,50 ml; 0,50 mmoles), con agitación, bajo nitrógeno. Se retiró el baño de hielo seco-acetona y se llevó la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 3 h. Se enfrió la mezcla de reacción a 0°C y se añadió gota a gota metanol (0,2 ml) seguido por HCl al 10% (10 ml). Se permitió que esto se calentara a temperatura ambiente y se extrajo la mezcla con éter (2 x 20 ml). Se lavó la capa de éter con salmuera (1 x 20 ml), se secó (Na_2SO_4) y se concentró a vacío para dar un residuo oleoso (0,113 g). Esto se puso en una columna súbita de gel de sílice (1 x 30 cm) y se eluyó con Et_2O -hexano al 30% para dar una mezcla 1:1 de (9E)- y (todo-E)-3 (0,068 g; rendimiento del 67%). Se llevó la mezcla de alcohol en esta forma sin más purificación.

ES 2 347 739 T3

(2Z,4E)- y (2E,4E)-4-(3',4'-Dihidro-1'(2'H)-naftalen-1'-ilideno)-3-metil-2-butenal ((9Z)- y (*todo-E*)-4)

A una disolución agitada de alcohol 3 (0,065 g; 0,30 mmoles) en CH_2Cl_2 seco (10 ml) a 0°C, bajo nitrógeno, se añadieron tamices moleculares de 4 Å (1,5 g) seguido por MnO_2 activado (0,53 g; 6,1 mmoles) y se agitó la mezcla a 0°C durante 3 h. Se filtró la mezcla de reacción por una almohadilla de gel de sílice súbita y se lavó el filtro con CH_2Cl_2 /éter al 50% frío (100 ml). Se concentró a sequedad el líquido filtrado a vacío para dar un aceite residual (0,05). Esto se puso en una columna de gel de sílice súbita (1 x 15 cm) y se eluyó con Et_2O -hexano al 10% para dar (9Z)-4 (0,018 g), (*todo-E*)-4 (0,016 g) y alcohol 3 de partida (0,007 g). El rendimiento total de 4 fue 0,034 g (rendimiento del 59% basado en alcohol de partida no recuperado).

Procedimiento General para la Olefinación de Isómeros Individuales de Aldehído 4

Se lavó NaH (1,2 eq) en THF seco tres veces para eliminar aceite de parafina. A 0°C en N_2 se añadió fosfonosencioato de trietilo (1,1 equiv.) recién destilado en THF. Después de agitar la mezcla durante 30 min, se añadió HMPA (0,2 equiv.) seguido por éter (9Z)- o (*todo-E*)-4 (1 equiv., concentración final 0,8 M). Después de que hubo reaccionado la mezcla durante 120 min a temperatura ambiente, se añadió agua y se repartió la mezcla de reacción entre éter y agua. Se lavó la capa de éter una vez con salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró a vacío para dar éster como mezcla de principalmente dos isómeros configuracionales. Por este método se preparó lo siguiente.

(2E,4E,6Z,8E)- y (2Z,4E,6Z,8E)-8-(3',4'-Dihidro-1'(2'H)-naftalen-1'-ilideno)-3,7-dimetil-2,4,6-octatrienoato de etilo ((9Z)- y (9Z,13Z)-5)

Esta preparación empleó una suspensión de NaH (0,060 g; 2,5 mmoles) en THF seco (1 ml), una disolución de fosfonosencioato de trietilo (0,14 g; 0,53 mmoles) en THF seco (1 ml), HMPA (0,041 g; 0,21 mmoles) y una disolución de (9Z)-4 (0,089 g; 0,42 mmoles) en THF seco (1 ml) para dar una mezcla 2:1 de ésteres (9Z)- y (9Z,13Z)-5 (0,12 g; rendimiento del 78%). Esta mezcla se preparó por HPLC en gel de sílice usando Et_2O al 0,5%, THF 01% en hexano.

(2E,4E,6E,8E)- y (2Z,4E,6E,8E)-8-(3',4'-Dihidro-1'(2'H)-naftalen-1'-ilideno)-3,7-dimetil-2,4,6-octatrienoato de etilo ((*todo-E*)- y (13Z)-5)

Esta preparación empleó una suspensión de NaH (0,050 g; 2,1 mmoles) en THF seco (1 ml), una disolución de fosfonosencioato de trietilo (0,11 g; 0,40 mmoles) en THF seco (1 ml), HMPA (0,048 g; 0,22 mmoles) y una disolución de (*todo E*)-4 (0,065 g; 0,31 mmoles) en THF seco (1 ml) para dar una mezcla 2:1 de ésteres (*todo-E*) y (13Z)-5 (0,12 g; rendimiento del 78%). Esta mezcla se separó por HPLC sobre gel de sílice usando Et_2O al 1%, THF al 0,5% en hexano.

Procedimiento para la Hidrólisis de Isómeros Individuales del Éster 5

A una disolución del éster 5 (1 equiv.) en metanol (concentración final 0,061 M) se añadió una disolución acuosa de KOH 2 M (10 equiv.). Se calentó esta disolución para hacerla hervir a reflujo y se controló el progreso de la reacción por TLC. Después de 90 min se vertió la disolución caliente en un vaso de precipitados de hielo (40 g) y se acidificó con HCl al 10% hasta pH 2. Después se extrajo la mezcla con Et_2O , que se lavó con salmuera, se secó (Na_2SO_4) y se concentró bajo presión reducida para dar el producto. La RMN reveló que la hidrólisis tenía lugar sin isomerización. Se sintetizaron los siguientes ácidos por este método.

Ácido (2E,4E,6E,8E)-8-(3',4'-Dihidro-1'(2'H)-naftalen-1'-ilideno)3,2-dimetil-2,4,6-octatrienoico ((*todo-E*)-UAB30)

Esta preparación utilizó una disolución de KOH (0,258 g; 4,61 mmoles) en agua (2 ml) y una disolución caliente de éster (*todo-E*)-5 (0,122 g; 0,378 mmoles) en metanol (10 ml) para proporcionar ácido (*todo-E*)UAB30 (0,104 g; rendimiento del 93%) como un sólido amarillo; pf 192-197°C (ciclohexano).

Ácido (2E,4E,6E,8E)-8-(3',4'-Dihidro-1'(2'H)-naftalen-1'-ilideno)3,7-dimetil-2,4,6-octatrienoico ((9Z)-UAB30)

Esta preparación utilizó una disolución de KOH (0,15 g; 2,8 mmoles) en agua (1 ml) y una disolución caliente de éster (9Z)-5 (0,073 g; 0,23 mmoles) en metanol (3 ml) para proporcionar ácido (9Z)-UAB30 (0,065 g; rendimiento del 98%) como un sólido amarillo; pf 182-185°C (ciclohexano).

Ácido (2E,4E,6E,8E)-8-(3',4'-Dihidro-1'(2'H)-naftalen-1'-ilideno)3,7-dimetil-2,4,6-octatrienoico ((13Z)-UAB30)

Esta preparación empleó una disolución de KOH (0,085 g; 1,50 mmoles) en agua (1 ml) y una disolución caliente de éster (13Z)-5 (0,040 g; 0,12 mmoles) en metanol (4 ml) para proporcionar ácido (13Z)-UAB30 (0,034 g; rendimiento del 93%) como un sólido amarillo; pf 180-185°C (ciclohexano).

Ejemplo 2

Biología de Análogos de Ácido Retinoico

5 El ensayo de unión de CRABP de piel de pollito midió valores IC_{50} para unión de retinoides a CRABP-II usando un ensayo de competición de radiomarcado (8-10). Los valores de IC_{50} para retinoides con RAR y RXR se midieron con un ensayo de competición de radiomarcado (8-10). Los ensayos de actividad transcripcional del receptor nuclear se realizaron usando células CV-1. La transfección transitoria de estas células con un plásmido de ADN se realizó esencialmente como se describe en Alam *et al* (9). El ensayo de antipapiloma de piel de ratón midió los valores ED_{50} para la inhibición de tumores con retinoides en la piel dorsal de ratones. La inhibición del papiloma de piel de ratón por retinoides se realizó según una modificación del procedimiento desarrollado por Verma y Boutwell (14) como se indicó previamente por Muccio *et al* (8).

15 Ejemplo 3

Células

Se obtuvieron células NB4 de Dr Waxman después de que las hubiese recibido del Dr. M. Lanotte. Las células NB4 se mantuvieron en cultivo en RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY) enriquecido con FBS (suero fetal bovino) al 10% (v/v) (GIBCO) y ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico 10 mM (pH 7,3). Se cultivaron las células a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en aire. Se estimó una densidad de células en un contador de partículas electrónico (Coulter electronic, Hialeah, FL) y viabilidad celular con exclusión con colorante azul de trypan. Las células NB4 no contenían micoplasma cuando se evalúa por el Laboratorio de micoplasma, centro de Investigación y Desarrollo del Cáncer NCI-Frederick, PRI/DynCorp, MD, usando colorante fluorescente Hoechst 33258 y métodos de detección de cultivo con agar (Del Giudice *et al.*, 1.984 monografía nº 5).

Ejemplo 4

30 *Inhibición de Actividad Transcripcional RAR α -Inducida por (todo-E)-AR en Células CV-1*

Los efectos antagonistas de los retinoides UAB30 en la transcripción de RAR α se determinaron en células CV-1. Los métodos son casi idénticos a los usados para realizar ensayos transcripcionales. Estos estudios utilizaron el TREpal que contenía gen indicador CAT con un activador de la timidina cinasa [(TREpal)₂-tk-CAT] como se describe por Vaezi *et al.* (11). Veinticuatro horas después de la transfección, se trataron las células con (todo E)-AR (1-1.000 nM) solo o junto con el retinoide UAB indicado (100 ó 1.000 nM). Después de 24 horas, se recogieron las células y se midieron los efectos transcripcionales relativos a la actividad CAT, después de la corrección con actividad β -gal para eficacia de transfección. Se hicieron estudios similares con un antagonista de RAR α conocido, Ro-41-5253. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se promediaron. Se definió antagonismo como una disminución de la actividad CAT relativa de la transcripción inducida por (todo-E)-AR en presencia de retinoides cuando se compara con controles positivos que no contenían retinoides. Tanto (todo-E)-UAB30 como Ro-41-5253 presentaron antagonismo a cada concentración de (todo-E)-AR usada para inducir la transcripción, pero los efectos no fueron perceptibles cuando (todo-E)-AR fue 50 nM.

Ejemplo 5

Inducción de Retinoides de Diferenciación de células HL-60 y NB4

50 Se usaron HL-60 y NB4 líneas celulares de leucemia humana para medir la capacidad de los retinoides para inducir la diferenciación terminal. Ambas líneas celulares son predominantemente promielocitos y se inducen por ácido retinoico para madurar células con muchas características de granulocitos maduros. La inducción de esta diferenciación es la base para ensayar una de las actividades biológicas de análogos de ácido retinoico. Para el ensayo de diferenciación, se cultivaron células HL-60 o NB4 en medio nutriente con suero fetal bovino como detalla Breitman (15).

El ácido todo-trans-retinoico y nitroazul de tetrazolio (NBT) se adquirieron en Sigma Chemical Co. St Louis, MO. Los isómeros todo-trans y 9-cis de UAB8 y UAB30 se sintetizaron según los métodos descritos previamente (Alam *et al.* 1.995; Muccio *et al.*, 1.998). Se disolvieron ATRA y retinoides UAB en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 0,1 a 10 mM y después se diluyó, 1.000 veces para tratamiento celular. El crecimiento y la diferenciación de células NB4 se realizaron según métodos descritos previamente (Breitman, 1.990, Methods Enzymol. 190, 118; Taimi & Breitman, 1.997, Experimental Cell Research, 230, 69). Después de 3 días de incubación, se evaluó la diferenciación celular por la capacidad para reducir NBT como el porcentaje de células con depósitos de nitroazul de diformazan asociado a las células que resultan de la reducción de NBT (Breitman, 1.990, Methods Enzymol. 190, 118). El porcentaje de células que consiguió este marcador se midió microscópicamente. El porcentaje de células positivas se representó entonces gráficamente como una función de la concentración de retinoides para determinar valores de ED_{50} y ED_{30} usados en la formación de isobolos.

Ejemplo 6

Ensayos de Transinfección Transitoria para Agonistas y Antagonistas RAR

Los ensayos de transinfección transitoria para inducción de retinoides ATRA o UAB de la transcripción mediada por o RAR- α o RXR- α se midieron usando los métodos indicados previamente (Alam *et al.*, 1.995, J. Med. Chem. 38, 2.302). Estos ensayos se realizaron en células CV-1 con el gen RAR o RXR y el gen informador cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) que contiene TREpal con un activador de timidina cinasa [(TREpal)₂-tk-CAT]. Veinticuatro horas después de la transinfección, las células se trataron con una dosis única de retinoide y se ensayaron los extractos de células para b-galactosidasa y actividad CAT. Los efectos antagonistas de retinoides UAB30 en la transcripción de RAR- α también se determinaron en células CV-1. Los métodos son casi idénticos a los usados para realizar ensayos transcripcionales. Estos estudios utilizaron el gen informador CAT [(TREpal)₂-tk-CAT]. Veinticuatro horas después de la transinfección las células se trataron con ATRA (1 a 1.000 nM) solo o junto con el retinoide UAB indicado (100 ó 1.000 nM). Después de 24 horas, se recogieron las células y se midieron los efectos transcripcionales en actividad CAT relativa, después de corrección con actividad de β -galactosidasa para eficacia de transinfección. Se hicieron estudios similares con un antagonista RAR- α conocido, Ro-41-5253. Se realizaron experimentos por triplicado y se promediaron los datos. Se definió antagonismo como una disminución de la actividad CAT relativa de transcripción inducida por ATRA en presencia de retinoides cuando se compara con controles positivos que no contenían retinoide.

Ejemplo 7

Ensayos de Transinfección Transitoria para Actividad Anti-AP-1

Se transinfectaron células HeLa con -73 Col-CAT en que el activador de collagenasa que contiene un sitio de unión a AP-1 está unido con el gen CAT junto con el vector de expresión de los receptores de retinoides indicado. Veinticuatro horas después de transinfección, las células se mantuvieron en suero fetal bovino al 0,5% y se trataron con la concentración de retinoides indicada con o sin TPA (100 mg/ml) durante 24 horas. Se cosecharon las células y se determinaron las actividades CAT y se corrigieron con la correspondiente actividad de β -galactosidasa para eficacia de transinfección.

Ejemplo 8

Inhibición de Formación de Colonias CFU-GM Espontáneas JMML

Se ensayó en los retinoides (*todo-E*)- y (9Z)-AR, UAB8 y UAB30 su capacidad para inhibir el crecimiento de colonias CFU-GM espontáneo en tres muestras de pacientes JMML como describe Emanuel *et al.*, (5, 16). Brevemente, después de obtener el consentimiento de los padres y con la aprobación del Institutional Review Board, se recogieron muestras de sangre periférica y médula ósea JMML de pacientes y se envió por entrega durante la noche a la Universidad de Alabama en Birmingham. Se separaron células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad, se lavaron y se congelaron en alícuotas. Más tarde se congelaron alícuotas de muestras de pacientes JMML, se lavaron y se montaron en ensayos clonales de agar suave al 0,3% en medio 5A de McCOY enriquecido con nutrientes así como suero fetal bovino al 15%. No se añadieron factores de crecimiento u otro estímulo exógeno a los cultivos. Se disolvieron retinoides UAB e isómeros de ácido retinoico en o etanol al 100% o DMSO. Se hicieron diluciones apropiadas y se montaron controles usando la respectiva concentración de etanol o DMSO en paralelo. Se añadieron dosis variables de retinoides sólo una vez, 24 horas después de la iniciación de los ensayos con agar suave pipeteando la disolución de retinoides en la parte superior del agar suave y permitiendo que la disolución entrara en el agar e interactuara con la células por difusión. Se incubaron los cultivos durante 14 días a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Se puntuaron las colonias CFU-GM (1 colonia tiene > 40 células) y la cantidad resultante de inhibición de crecimiento de colonias CFU-GM espontáneo se comparó con (13Z)-AR.

Ejemplo 9

Eficacia de UAB-30 en Tumores Malignos de Mama Inducidos por MNU

Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley hembras obtenidas de Harlan Sprague-Dawley, Inc. (colonia sin virus número 218). Las ratas llegaron a los 28 días de edad y tuvieron una dieta de Teklad (4%) el día de la llegada. A los 50 días de edad, las ratas recibieron una inyección IV de metilnitrosourea (MNU) (50 mg/kg de peso corporal) por la vena yugular. Se adquirió MNU en Ash-Stevens, Inc. Comenzando a los 53 días de edad se les administró a las ratas (9Z)-UAB30 en la dieta (200 mg/kg de alimentación). Se pesaron las ratas una vez a la semana, se palparon los tumores mama dos veces a la semana y se comprobaron a diario los signos de toxicidad. Los pesos corporales de las ratas se analizaron estadísticamente 5 semanas, 10 semanas y 15 semanas después de la administración inicial de (9Z)-UAB30. A los 140 días después de inducción de MNU, se terminó el estudio. Se pesaron todos los tumores de mama cuando se retiraron en necropsia y se clasificaron histológicamente.

Ejemplo 10

Modelización Molecular

5 Se generaron estructuras retinoides con versión Sybyl 6.2 (Trips Inc., St. Louis, MO) en una estación de trabajo Graphics Indigo 2 de silicio. La estructura de (9Z)-2 se construyó usando la estructura de cristal de rayos-x indicada recientemente (17). Esta estructura cristalizó en la conformación 8-*s-trans*. Para generar las conformaciones 8-*s-cis* se
 10 2. Los parámetros termodinámicos se calcularon según los métodos descritos previamente (8).

Ejemplo 11

15 *Generación de Nuevos Compuestos*

La Figura 3 resume los métodos empleados para preparar UAB30. La propuesta fue similar a la que se indicó previamente para la síntesis de los retinoides UAB alquil-sustituidos (por ejemplo, UAB8) (9, 10), excepto que se
 20 usó α -tetralona como enona de partida (1 en la Figura 1). Empezando con las cetonas apropiadas, se usaron métodos similares para preparar todos los retinoides pertenecientes a las estructuras generales I y III (Figuras 1 y 2).

La numeración de los átomos en la Figura 3 no es sistemática para permitir una comparación fácil con ácido retinoico. Como se indicó anteriormente (9), no se detectó una δ -lactona intermedia en estas condiciones pero se asume que es un compuesto intermedio en la producción de (9Z)-2. A diferencia de informes anteriores para compuestos
 25 relacionados (8-10), la reducción de ácido (9Z)-2 a alcohol 3 estuvo acompañada por la isomerización para dar una mezcla 1:1 de isómeros *todo-E*- y 9Z. Esta mezcla se oxidó con MnO₂ para dar una mezcla comparable de aldehídos (4), que se separó de manera preparativa usando cromatografía súbita sobre gel de sílice. Cada isómero puro de 4 se olefinó como se muestra para proporcionar una mezcla de o (9Z) o (9Z, 13Z) o (*todo-E*) y (13Z)-5. Cada mezcla se
 30 separó de manera preparativa por HPLC sobre gel de sílice (Et₂O al 0,5%, THF al 0,1% en hexano para la primera y Et₂O al 1%, THF al 0,5% en hexano para la última) usando métodos similares al descrito (8-11). Isómeros individuales del éster 5 se hidrolizaron después a los correspondientes ácidos en KOH, sin isomerización E/Z (12). La pureza isomérica para los ácidos finales (>97%) se verificó por RMN y HPLC de fase inversa (8-11). Los rendimientos experimentales y los datos seleccionados para los compuestos intermedios y los productos en la Figura 1 se resumen
 35 en la Tabla 1. Los datos espectrales UV/vis de los isómeros purificados se dan en la Tabla 1 y las asignaciones RMN de ¹H completas se recogen en la Tabla 2.

40 (Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 347 739 T3

TABLA 1

Datos Seleccionados para Nuevos Compuestos Producidos

Compuesto	Porcentaje aislado		UV/vis ^b			IR ^c		MS	
	rendimiento	R _f ^a	λ ₉₄₈₈	g		C=O	C=C	m/z	
(9z)-2	86	0,35	310	14	000	1.673	1.618	ND	
(9z)- y (<i>todo-E</i>)-3	67	0,21	264	12	000	(3.334)	1.630	214,1	
(9z)-4	59 ^d	0,48	295	6	000		1.662	1.609	212,1
(<i>todo-E</i>)-4	59 ^d	0,42	298	8	200		1.662	1.605	212,1
(9z)-5 ^e	78	0,59	328	29	300	1.701	1.602	322,2	
(<i>todo-E</i>)-5	92	0,57	358	35	000		1.708	1.605	322,2
(13Z)-5	92	0,57	358	30	000		1.709	1.604	322,2
(9z)-UAB30 ^f	98	0,12	328	30	200		1.672	1.594	294,2
(<i>todo-E</i>)- UAB30	93	0,09	358	32	500	1.672	1.598	294,2	
(13Z)- UAB30	93	0,12	359	26	000	1.673	1.596	294,2	

^aLos valores son sobre gel de sílice usando éter/hexano como eluyente: Et₂O al 30%, 3 y 4; Et₂O al 20%, 2; Et₂O al 10%, 5 y UAB30. ^bLa longitud de onda máxima (nm) y los coeficientes de extinción (M⁻¹cm⁻¹) se obtuvieron en ciclohexano (5) o metanol (UAB30, 4) a temperatura ambiente. ND: no determinado. ^cLas frecuencias de estiramiento de IR (cm⁻¹) se obtuvieron como películas delgadas en discos de NaCl. La frecuencia de estiramiento de OH del compuesto 3 se indica entre paréntesis. ^dEl rendimiento para la mezcla de isómeros E/Z. ^eEl éster 5 se separó de manera preparativa en una columna de fase normal M20/50 Whatman Partisil 10 con Et₂O al 1,0% y THF al 0,5% en hexano con un caudal de 5 ml/min (9). Los tiempos de retención fueron 138,6 min (13Z), 140,2 min (9Z) y 142,6 min (*todo-E*). Las fracciones que se volvieron a inyectar mostraron un isómero cuando se controlaron a 300 ó 340 nm. ^fEn los isómeros UAB30 se analizó la pureza isomérica por cromatografía de fase inversa usando una columna Spherisorb ODS C-18 con ácido acético al 1% en acetonitrilo (3:7) con un caudal de 1,0 ml/min. Usando detección a 340 nm (donde cada isómero tenía coeficientes de extinción muy similares), se determinaron las relaciones isoméricas de las áreas de pico integradas. Las relaciones isoméricas fueron mayores que 95% para cada isómero.

TABLA 2
Asignaciones de Desplazamiento Químico de RMN de ¹H (ppm, TMS) para Retinoides UAB30 a 400 MHz.

Compuesto	H-1 ^a	H-2 ^b	H-4	H-3	H-2	H-1	H-8	H-10	H-11	H-12	H-14	H-18	9Me	13Me
α-tetralona	2,11	2,63	7,22	7,44	7,27	8,01							2,94	
(9Z)-2	1,84	2,57	7,09	7,17	7,16	7,66	7,14	5,79	11,79			2,80		2,13
(todo-E)-3	1,82	2,70	7,16	7,15	7,58	6,39	5,62		4,29			2,80		1,86
(9Z)-3	1,82	2,36	7,08	7,16	7,14	7,58	6,36	5,55	4,06			2,83		1,85
(todo-E)-4	1,86	2,76	7,22	7,20	7,61	6,49	6,04		10,10			2,83		2,35
(9Z)-4	1,86	2,50	7,23	7,19	7,64	6,57	6,01		9,65			2,86		2,09
(todo-E)-5	1,85	2,78	7,15	7,15	7,58	6,51	6,23		6,96	6,28	5,79	2,81		2,08
(9Z)-3	1,83	2,41	7,12	7,19	7,19	7,64	6,47	6,11	6,64	6,23	5,75	2,85		1,98
(13Z)-5	1,84	2,78	7,15	7,15	7,58	6,50	6,34		6,95	7,79	5,65	2,80		2,07
(todo-E)	1,85	2,78	7,10	7,17	7,15	7,58	6,52	6,25	7,01	6,32	5,82	2,81		2,09
-UAB30							6,52							
(9Z)-UAB30	1,84	2,41	7,12	7,20	7,20	7,59	6,48	6,12	6,69	6,25	5,77	2,85		1,99
(13Z)-UAB30	1,84	2,79	7,08	7,15	7,15	7,58	6,51	6,35	7,00	7,74	5,56	2,79		2,08

Ejemplo 12

Estudios de la Estructura

La estructura del cristal de rayos X de (9Z)-2 se indicó recientemente (17), que cristalizaba en una conformación 8-*s-trans*. Para comparar la estructura de rayos X de (9Z)-2 a la generada por mecánica molecular, los cálculos de MM3 de Allinger (94) se realizaron como se describe para calcular las estructuras de retinoides UAB1-UAB8 (8). La estructura calculada de este compuesto intermedio fue muy similar a la estructura de estado sólido. Los ángulos torsionales $\psi_{5,6,7,8}$ fueron casi planos (-160°) en cada estructura, como otros retinoides UAB con sustituyentes alquilo (8). El ángulo torsional $\psi_{7,8,9,10}$ fue -133° para la estructura por mecánica molecular y $-134,3^\circ$ en la estructura del cristal. Este ángulo es no plano debido a interacciones estéricas entre el metileno C2' y el grupo metilo C19. También se generaron las estructuras de la mecánica molecular de retinoides (9Z)- y (*todo-E*)-UAB30. Cuando se comparan con los isómeros UAB8 (8), los conformeros de baja energía esperados son muy similares; el anillo aromático de retinoides UAB30 ocupa espacio que es muy similar al de los grupos alquilo (R1 = Et; R2 = 'Pr) de UAB8.

Se observó previamente que el conformero 8-*s-cis* era tan estable como el conformero 8-*s-trans* para diferentes retinoides UAB (8). También se calcularon las estructuras de baja energía del conformero 8-*s-cis* de isómeros UAB30. Los ángulos torsionales $\psi_{5,6,7,8}$ eran casi idénticos al del conformero 8-*s-trans* y el ángulo $\psi_{7,8,9,10}$ fue -70° . Además, el conformero 8-*s-cis* era ligeramente más estable ($\Delta G \approx 1$ kcal/mol) que el correspondiente conformero 8-*s-trans*.

Se realizaron experimentos Nuclear Overhauser (NOESY) (2D) en (9Z)-2 en CDCl₃. Se observaron NOE significativos entre H-19 y H-2' (consistente con el conformero 8-*s-trans*) y entre H-19 y H-8 (consistente con el conformero 8-*s-cis*). En relación con la intensidad de cruce de picos muy intensa encontrada entre los protones metílicos H-19 y H-10 (indicando la configuración 9Z), las intensidades negativas de los cruces de picos observada entre H-19/H-2' y H-19/H-8 fueron aproximadamente la mitad de esta intensidad integrada. Se obtuvieron resultados similares de experimentos NOESY en isómeros *todo-E* y 9Z de UAB30. Los resultados NOE son en soporte de los cálculos MM3 que identificaron dos conformeros de baja energía alrededor del enlace C8-C9 en la cadena de polieno de estos retinoides.

Ejemplo 13

Afinidad de Unión a CRABP

Los valores IC₅₀ se evaluaron en un ensayo de unión de radioligando CRABP de piel de pollito con [³H]-(*todo-E*)-AR como el radioligando (18). A un exceso de 100 veces de retinoide UAB no marcado, (*todo-E*)-UAB30 inhibió la unión de [³H]-AR por sólo el 75%; (13Z)-UAB30 (inhibición del 28%) y (9Z)-UAB30 (inhibición del 5%) presentaron incluso menos afinidad por CRABP. La menor afinidad de los isómeros UAB30 (IC₅₀ > 2.000 nM) relativa a los isómeros *todo-E* de AR (IC₅₀ = 600 nM) es especialmente sorprendente puesto que los retinoides UAB7 y UAB8 presentaron afinidades de unión comparables con la de AR. Aparentemente, los restos de anillo aromático de UAB30 no interactúan tan bien como los grupos alquilo voluminosos de UAB8 en el sitio de unión de AR de CRABP, incluso aunque estos grupos estén colocados en una región similar del espacio en disolución.

Ejemplo 14

Afinidad de Unión del Receptor Nuclear y Actividad Transcripcional

Se evaluó en los isómeros *todo-E*-, 9Z- y 13Z- de UAB30 su capacidad para inhibir la unión de [³H]-(*todo-E*)-AR a los RAR. Para estudiar el proceso de inhibición, se expusieron primero receptores nucleares (RAR α , RAR β , RAR γ y RXR α) a retinoides UAB 1.000 nM y [³H]-(*todo-E*)-AR 5 nM. Esto se comparó con un control positivo usando (*todo-E*)-AR no marcado 1.000 nM y un control no usando retinoide. Para los retinoides activos, se determinaron valores IC₅₀ por valoración con concentraciones variables de retinoides UAB.

(*todo-E*)-UAB30 fue el único isómero UAB30 que se unió eficazmente a los RAR. Los valores IC₅₀ (30-50 nM) para los RAR sólo fueron aproximadamente 5 veces mayores que los de (*todo-E*)-AR o (*todo-E*)-UAB30 (Tabla 3) y comparables con el de (9Z)-AR. Los valores IC₅₀ para (9Z)-UAB30 fueron >1.000 nM indicando que no se unían a receptores de RAR (Tabla 3), que es consistente con los datos en (9Z)-UAB8. La baja afinidad para los RAR no es compartida por (9Z)-AR, que casi se une tan bien como (*todo-E*)-AR a estos receptores. También, (13Z)-UAB30 fue un ligador ineficaz para los subtipos RAR, que es diferente de las propiedades de unión de (13Z)-UAB8 a estos receptores nucleares (9).

TABLA 3

Valores^a de IC_{50} y EC_{50} (nM) para Retinoides UAB8 y UAB30 en Ensayo de Unión de Receptores Nucleares y Activación Transcripcional

Isómero	IC_{50} (nM)				EC_{50} (nM)			
	<u>RARα</u>	<u>RARβ</u>	<u>RARγ</u>	<u>RXRα</u>	<u>RARα</u>	<u>RARβ</u>	<u>RARγ</u>	<u>RXRα</u>
<u>Retinoide</u>								
<u>RARα/RXRα</u>								
(<i>todo-E</i>)-AR	6	5	4	>2.000	22	2	6	>2.000
(9Z)-AR ^b	31	8	60	82	18	27	10	27
(<i>todo-E</i>)-UAB8	14	6	10	>2.000	33	20	2	>2.000
(13Z)-UAB8 ^b	900	371	708	>1.000	51	150	42	>2.000
(9Z)-UAB8	>1.000	>1.000	>1.000	868	>1.000	>2.000	190	220
(<i>todo-E</i>)-UAB30	35	49	55	>2.000	>2.000	110	370	>2.000
(13Z)-UAB30	>1.000	>1.000	>1.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000
(9Z)-UAB30	>2.000	>2.000	>2.000	284	>2.000	>2.000	>2.000	118

^aLos valores de IC_{50} y EC_{50} se calcularon por un análisis Probit de una curva dosis-respuesta usando concentraciones entre 1 y 1.000 nM. El error estándar en los valores IC_{50} indicados fue $\pm 2,0$ nM o menos.

El error estándar en los valores EC_{50} indicados fue $\pm 2,5$ nM o menos, excepto para el valor EC_{50} indicado para la activación de RAR γ por (9Z)-AR, que fue ± 4 nM. Los valores de IC_{50} se tomaron de Alam et al. (9).

Se evaluaron los isómeros UAB30 en ensayos que miden su actividad funcional en células para inducir actividad transcripcional mediada por RAR α -, RAR β - y RAR γ . Las células CV-1 se transfectaron de manera transitoria con plásmido de ADN del subtipo RAR apropiado y (TREpal)₂-tk-CAT (9, 19). Usando una curva dosis-respuesta, se midieron y después se compararon con los encontrados para (*todo-E*)- y (9Z)-AR y para (*todo-E*)- y (9Z)-UAB8 (Tabla 3). Transcripción activada por receptores mediada por RAR β inducida por (*todo-E*)-UAB30; sin embargo, se requirieron concentraciones 5 veces mayores para conseguir una activación similar a las observadas para (9Z)AR o (*todo-E*)-UAB8. (*todo-E*)-UAB30 mostró una actividad moderada en la inducción de transcripción mediada por RAR γ y no presentó actividad para inducir transcripción RAR α . Como tal este isómero UAB30 muestra selectividad de los subtipos RAR β y RAR γ y propiedades antagonistas de RAR α , que es muy diferente a (*todo-E*)-UAB8 -un agonista *pan*-RAR muy eficaz. (13Z)-UAB30 mostró propiedades transcripcionales de receptores nucleares muy diferentes a las de su análogo de UAB8; no presentó actividad en la inducción de expresión génica mediada por RAR, mientras que (13Z)-UAB8 fue un activador eficaz de transcripción génica mediada por los RAR β . (9Z)-UAB30 fue incluso un activador más deficiente de genes receptores mediados por los RAR; fue mucho menos activo en estos ensayos que (9Z)-UAB8.

La afinidad de unión de los isómeros UAB30 para RXR α se examinó a continuación. Sólo (9Z)-UAB30 inhibió la unión de [³H]-(9Z)-AR 20 nM a RXR α (Tabla 3). Un exceso de 100 veces de retinoide UAB no marcado, (9Z)-UAB30 inhibió el 70% de la actividad en relación con (9Z)-AR. El valor IC_{50} para este isómero fue mejor que para (9Z)-UAB8 y sólo 4 veces mayor que el de (9Z)-AR. Los otros isómeros fueron mucho menos eficaces (IC_{50} >2.000 nM). Cuando el efecto en la actividad transcripcional mediada por homodímero RXR α por (9Z)-UAB30 fue aproximadamente 4 veces menos eficaz que por (9Z)-AR pero 2 veces mejor que por (9Z)-UAB38. De los isómeros (9Z)-UAB, UAB30 es el ligando más potente y selectivo para la activación de los RXR.

Puesto que (*todo-E*)-UAB30 se une bien a RAR α (IC_{50} =35 nM) pero no se activó este receptor bien (EC_{50} >1.000 nM), se evaluó a continuación su potencial para actuar como antagonista RAR α . Se evaluaron concentraciones de (*todo-E*)-AR fijadas que oscilan entre 1 y 1.000 nM en el ensayo transcripcional mediado por homodímeros RAR α usando dos concentraciones de (*todo-E*)-UAB30 (10 ó 100 nM). Estos se compararon con un control negativo de (*todo-E*)-AR solo y un control positivo usando Ro-41-5253, un antagonista de RAR α conocido, a 10 y 100 nM. Para concentraciones 50 y 100 nM de (*todo-E*)-AR, la actividad CAT relativa de las células tratadas con 100 nM de (*todo-E*)-UAB30 disminuyó en relación con las que contenían sólo (*todo-E*)-AR. Esta disminución de la actividad CAT es consistente con antagonismo de ácido retinoico por (*todo-E*)-UAB30, pero la magnitud de estos efectos fue 2 veces menor que la demostrada por Ro-41-5253.

Ejemplo 15

Quimioprevención de Papiloma de Piel de Ratón

Se evaluó en los retinoides UAB30 a continuación su actividad en la prevención de la inducción química de los papilomas en piel de ratón (14). Tanto (*todo-E*)-AR como (*todo-E*)-UAB8 fueron muy eficaces en este ensayo quimio-preventivo. A una dosis de 45,9 nmoles, evitaron completamente la formación de tumor (95% para ácido retinoico; 99% de UAB8). Los valores de ED₅₀ para estos retinoides fueron 3,0 (AR) y 2,5 (UAB8) nmoles (8). (*todo-E*)-UAB30 fue menos eficaz que este ácido retinoico o isómero UAB8 en el ensayo de antipapiloma de piel; sólo redujo un 59% de los papilomas a 45,9 nmoles. Usando curvas dosis-respuesta, un ED₅₀ no se pudo determinar con precisión para este retinoide, consistente con los esfuerzos para cuantificar la actividad de otros retinoides UAB marginalmente activos (8). Previamente, la alta actividad de (*todo-E*)-UAB8 (que contenía grupos alquilo grandes a R1 y R2) se correlaciona (en relaciones estructura-actividad) con su unión y/o activación eficaz de los RAR. Usando estas tendencias, la actividad reducida de (*todo-E*)-UAB30 puede ser debida a su deficiente capacidad para activar RAR γ y/o ausencia de capacidad para activar RAR α (Tabla 3), especialmente en comparación con (*todo-E*)-UAB8 que presenta excelente actividad RAR γ . El isómero (9Z)-UAB8 también era menos eficaz que (9Z)-AR en este ensayo; sólo evitó el 54% de la formación de tumores a 45,9 nmoles, una dosis a la que (9Z)-AR era ligeramente activo (95%) (8). Esta baja actividad, sin embargo, es comparable con la de (9Z)-UAB8 en este ensayo (8). Puesto que tanto (9Z)-UAB8 como (9Z)-UAB30 son retinoides selectivos de RXR, no son eficaces activadores de rutas mediadas por RAR, en particular las mediadas por receptores nucleares de RAR β y RAR γ . Chandraratna *et al* (20) mostraron que los retinoides selectivos de RAR β y RAR γ son excelentes inhibidores de la actividad de la descarboxilasa de ornitina (ODC) inducida por TPA en la piel, un ensayo que se correlaciona bien con el ensayo antipapiloma de piel (14). Sugirieron que estos retinoides selectivos de RAR β y RAR γ eran potentes inhibidores de la actividad de la ODC *in vivo* por antagonización de la expresión génica mediada por AP-1 por unión de RAR α . Si éste es el caso, entonces (*todo-E*)-UAB30 (un antagonista de RAR α débil) no sería un antagonista de AP-1 eficaz, pero (*todo-E*)-UAB8 debería tener actividad para reprimir la transcripción génica de AP-1 además de su actividad de transcripción potente demostrada de homodímeros de RAR (Tabla 3).

Ejemplo 16

Transactivación y Transrepresión de Receptores Nucleares

Se evaluaron retinoides UAB8 y UAB30 previamente en ensayos de unión y transcripcionales de receptores nucleares RAR y RXR (Muccio *et al.*, 1.998). Se encontró que el *todo-trans*-UAB8 es un excelente agonista pan-RAR con propiedades similares a ATRA. 9-*cis*-UAB30 fue esencialmente un agonista selectivo de RXR con poca actividad para inducir la transcripción de RAR. 9-*cis*-UAB8 fue similar a 9-*cis*-UAB30 excepto que activaba débilmente RAR β y RAR γ . *Todo-trans*-UAB30 se unía bien a cada receptor RAR (valores de IC₅₀ 30-55 nM), pero sólo la transcripción activada mediada por RAR β y RAR γ . Para comprender si *todo-trans*-UAB30 puede actuar como antagonista de RAR- α , se estudiaron los efectos de este retinoide en la transcripción mediada por RAR- α inducida por ATRA. Como se muestra en la Figura 5, dosis crecientes de *todo-trans*-UAB30 (10 a 1.000 nM) redujo la transcripción mediada por RAR- α por ATRA a una dosis fija. Ro-41-5253, un antagonista de RAR- α conocido (Apfel *et al.*, 1.992, PNAS, 89, 7.129) produce una tendencia similar a la observada por *todo-trans*-UAB30, pero es dos veces más activo.

ATRA reprime la transcripción de los genes AP-1 (c-Jun/c-Fos) de una manera dependiente de la dosis. Para estudiar los retinoides UAB, se usó el activador de colágeno que contiene un sitio de unión a AP-1 unido al gen CAT. Junto con el vector de expresión del receptor de retinoide RAR- α , se midió la represión de la expresión de los genes inducida por TPA para los diferentes retinoides UAB en relación con ATRA. Como se muestra en la Figura 6, los isómeros *todo-trans* de UAB8 y UAB30 fueron ambos tan eficaces como ATRA en la reducción de la expresión de los genes inducida por TPA. Los isómeros 9-*cis* de los retinoides UAB8 y UAB30 sólo eran muy eficaces a dosis altas. Así, *todo-trans*-UAB8 comparte las propiedades de ATRA; es un excelente agonista de pan-RAR y es muy activo en la trans-represión de AP-1. Interesantemente, *todo-trans*-UAB30 sólo reprime la transcripción de AP-1 como otros retinoides descubiertos (Fanjul *et al.*, 1.994, Nature, 372, 107; Nagpal *et al.*, 1.995, J. Biol. Chem. 270, 923).

Ejemplo 17

Diferenciación Inducida por Retinoides de Células HL-60 y NB4

Para explorar el potencial de los retinoides UAB para el tratamiento de APL, se evaluaron los isómeros UAB8 y UAB30 en ensayos *in vitro* que medían su capacidad para inducir diferenciación de dos líneas celulares de leucemia APL, células HL-60 y NB4. Incluso aunque se aislaron células HL-60 de pacientes APL, sólo la línea celular NB4 contiene la traslocación t (15; 17) que implica que la RAR α forme la proteína de fusión RAR α /PML. Debido a que esta mutación característica se realiza de manera estable en células NB4, es un modelo mejor para juzgar la eficacia retinoide para esta enfermedad. Una comparación de la eficacia, que ATRA y otros retinoides UAB inducen diferenciación de células NB4 después de 3 días, se muestra en la Figura 7. *Todo-trans*-UAB8 es aproximadamente 10 veces más activo que ATRA durante un intervalo de dosis (ED₃₀ 110 frente a 810 nM). La actividad del ácido 9-*cis*-retinoico es comparable con la de ATRA (datos no mostrados); sin embargo, la actividad de 9-*cis*-UAB30, un

ligando altamente selectivo de RXR, presenta poca actividad incluso a dosis mayores de 1 mM ($ED_{30} > 10$ mM). Por el contrario a todo-trans-UAB8, todo-trans-UAB30 no es activo hasta 40 mM consistente con el antagonismo del receptor nuclear de RAR- α . La actividad de 9-cis-UAB8 es sólo 50% tan activa como ATRA ($ED_{30} > 3$ mM). Esta actividad puede ser debida a su capacidad para activar la transcripción mediada por RAR- α a dosis altas (Muccio *et al.*, 1.998).

Ejemplo 18

10 *Diferenciación Celular NB4 usando Retinoides en Combinación*

Los efectos sinérgicos potenciales se exploraron a continuación de usar agonistas RAR y RXR en asociación en diferenciación de células NB4. Como se indica en la Figura 8A, se trataron células NB4 con dosis variables de ATRA sólo y en asociación con isómeros UAB8 y UAB30. Las dosis de los retinoides UAB8 y UAB30 se eligieron para permitir actividad casi igual de cada retinoide en relación con ATRA (Berenbaum, 1.989, Pharmacol. Rev. 41:93). Cuando se trataron células NB4 con ATRA y 9-cis-UAB30, tuvo lugar una disminución de 10 veces en el valor de ED_{30} (día 3) para la diferenciación de células NB4. Puesto que 9-cis-UAB30 sólo no presentó efecto en la diferenciación de células NB4 (Figura 7), esto es un signo claro de sinergia entre estos dos retinoides. 9-cis-UAB30 potenció el efecto de ATRA y desplazó el ED_{30} de 810 a 50 nM (ATRA: 9-cis-UAB30 = 1:10). Efectos similares se observaron también para la diferenciación de células NB4 usando todo-trans-UAB8 en asociación con 9-cis-UAB8 (Figura 8B); el desplazamiento en ED_{30} fue de 110 a 25 nM. Los efectos sinérgicos no son tan evidentes usando 9-cis-UAB8; sin embargo, cuando se hacen isobolos también se observa sinergia (Breitman). La sinergia entre los agonistas selectivos RAR y RXR se ha observado en células NB4 (Chen *et al.*, 1.996, Nature, 382:819) usando otros análogos de retinoides. Los efectos observados aquí son comparables con los producidos usando el ligando selectivo de RXR BMS649 (SR11237) y otros agonistas selectivos de RAR.

También se evaluaron los efectos de combinación entre ATRA y todo-trans-UAB30 para evaluar los efectos de un antagonista de RAR- α en la diferenciación de células NB4. Los efectos de la combinación fueron los más evidentes a altas dosis de ATRA (Figura 8A) fueron el ED_{30} incrementado de 810 a 2.800 nM. En estudios similares con todo-trans-UAB8 (Figura 8B), todo-trans-UAB30 aumentó los valores de ED_{30} por aproximadamente 5 veces (de 660 a 3.000 nM). Puesto que todo-trans-UAB30 puede reprimir la transcripción de AP-1 pero es inactivo en la diferenciación de células NB4, es poco probable que este modo de acción desempeñe un papel importante para la diferenciación de células NB4. En su lugar, el antagonismo de la diferenciación de células NB4 tanto inducida por ATRA como inducida por todo-trans-UAB8 por todo-trans-UAB30 es lo más consistente con un mecanismo de acción que implica RAR- α .

Previamente Breitman y colaboradores han demostrado que la 4-hidroxifenilretinamida (4-HPR) sola no induce que se diferencien las células NB4 pero cuando se usa en asociación con ácido todo-trans-retinoico, aumenta la diferenciación de células NB4. El uso de la combinación de todo-trans-UAB8 con 4-HPR se estudió aquí para determinar si se podía inducir un efecto similar. La diferenciación de células NB4 aumentó significativamente cuando se expusieron células a 4-HPR 1 y 4 μ M con concentraciones variables de todo-trans-UAB8 (Figura 9). Los valores de ED_{50} de todo-trans-UAB8 se desplazaron 100 veces menos (50 nM) con adición de 4-HPR.

Ejemplo 19

45 *Metabolismo de Retinoides en Células NB4*

Se aislaron células NB4 de un paciente de APL que desarrolló resistencia clínica a tratamiento con ATRA (Lanotte *et al.*, 1.991, Blood, 77: 1.080). Estas células metabolizan ATRA rápidamente implicando una hidroxilasa citocromo P450 inducible (White *et al.*, 1.996, J BC, 271: 29922). Este metabolismo reduce rápidamente la eficacia de ATRA e inhibidores potenciales de esta enzima mejoran la eficacia de esta hormona en la diferenciación de células NB4.

Ejemplo 20

55 *Inhibición de Formación de Colonias CFU-GM de JMML*

En 1.991, Emanuel *et al* (21) demostraron que la formación espontánea de colonias CFU-GM observada en JMML se relaciona con la hipersensibilidad selectiva de células progenitoras hematopoyéticas de JMML a factor de estimulador de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés). Desde este informe inicial, otros (22) han confirmado estas observaciones de hipersensibilidad GM-CSF como un mecanismo patogénico en JMML. Adicionalmente en 1.991, Castleberry, Emanuel y colaboradores también presentaron pruebas preliminares de la capacidad de (13Z)-AR para inhibir un crecimiento CFU-GM espontáneo de JMML *in vitro* así como pruebas de su posible eficacia clínica en JMML (21). Este estudio clínico piloto sugirió que los efectos de (13Z)-AR en el tamiz *in vitro* están de acuerdo con su eficacia en el tratamiento de pacientes con JMML en el clínico (5). En este estudio, se evaluaron primero (todo-E)- y (9Z)AR en este ensayo *in vitro* y se demostró que estos isómeros AR también presentan excelente potencial para inhibir el crecimiento espontáneo de colonias CFU-GM en células aisladas de tres pacientes con JMML (Tabla 4).

Los efectos de los isómeros UAB8 y UAB30 sobre la inhibición de la proliferación de células de JMML humanas se estudiaron a continuación. Se evaluaron los isómeros de UAB8 en este ensayo usando células de dos pacientes (Tabla 4). (*todo-E*)-UAB8 fue tan eficaz como (*todo-E*)-AR en el control del crecimiento espontáneo de estas colonias CFU-GM. Sin embargo, (9Z)- y (13Z)-UAB8 fueron menos eficaces que los correspondientes isómeros AR en el control del crecimiento. En particular, para células J84 de pacientes hay una disminución de 2 veces en la actividad de estos retinoides. Para isómeros UAB30, el isómero más potente es el (13Z)-UAB30 que presenta actividad en dos pacientes sólo ligeramente menor que la de AR. Por el contrario para isómeros UAB8, los isómeros *todo-E* de este retinoide es menos activo que AR y (*todo-E*)-AUB8. También, (9Z)-UAB30 presenta menor actividad en este ensayo, similar al de (9Z)-UAB8.

TABLA 4

Valores^a ED₅₀ (nM) para Inducción de 4 días de Diferenciación de Células HL-60 y NB4 y Porcentaje de Inhibición^b Normalizado de Crecimiento de Colonias CFU-GM de Células JMML de 3 Pacientes

Isómero	ED50 (nM)		paciente J43(%)		paciente J83(%)		paciente J84 (%)		
	HL-60	NB4	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻¹ M
Retinoide									
(<i>todo-E</i>)-AR	120	610	100	74	100	88	100	52	33
(13Z)-AR	NE ^c	NE	109	100	94	86	87	52	5
(9Z)-AR	NE	NE	100	98	82	72	95	NE	NE
(<i>todo-E</i>)-UAB8	>10.000	320	98	85	NE		103	51	NE
(13Z)-UAB8	>10.000	280	80	61	NE		49	18	0
(9Z)-UAB8	3.400	910	79	52	NE		59	38	13
(9Z,13Z)-UAB8	>10.000	>10.000	59	32	NE		44	23	20
(<i>todo-E</i>)-UAB30	>10.000	>10.000	NE		72	68	57	48	28
(13Z)-UAB30	>1.000	>1.000	NE		88	82	80	72	25
(9Z)-UAB30	8.000	10.000	NE		79	76	39	44	3

^aLos valores ED50 se determinaron a partir de una curva dosis-respuesta usando cuatro concentraciones de retinoides que oscilan de 10⁻² a 10 M. ^bEl porcentaje de inhibición normalizado se calculó por (% inhibición de retinoide)/(% inhibición de (*todo-E*)-AR a 10⁻⁶M). El porcentaje de inhibición de (*todo-E*)-AR a 10⁻⁶M fue 85%, 78% y 61% para las células de pacientes J43, J83 y J84, respectivamente. ^cNE significa no ensayado.

No hay anomalías cromosómicas consistentes en JMML y ninguna que parezca implicar los receptores de retinoides. Sin embargo, un mecanismo muy plausible (23) para explicar los efectos de modulación aparentes de AR en la hipersensibilidad en GM-CSF en JMML es por los efectos antagonistas inducidos por AR de RAR α sobre el factor de transcripción, AP-1 (c-jun/c-fos). La cascada de transducción de la señal GM-CSF por Ras pareció tener como uno de sus principales criterios de valoración una regulación ascendente o activación del elemento de respuesta de AP-1. Este elemento respuesta es activado por c-jun/c-fos y cuando se estimula por señalización extracelular (por ejemplo, GM-CSF), la inducción de AP-1 conduce a proliferación celular entre otros procesos. De hecho en experimentos de Northern que investigan la expresión de los genes de respuesta temprana en JMML, Emanuel (22) han observado una regulación ascendente constitutiva aparente de tanto c-jun como c-fos, pero no *c-myc*. Pfahl (24) demostró en células epiteliales (25), que el mecanismo por el que AR reprime la transcripción de los genes mediada por AP-1 es línea celular específica y puede estar mediada por o los RAR o los RXR.

El mecanismo preciso para la alta actividad de (13Z)-AR en la inhibición de la proliferación de estas células progenitoras mieloides en JMML sigue siendo un área de investigación. Asumiendo un mecanismo basado en receptor, el isómero (13Z)-AR puede isomerizar o a (*todo-E*)- como a (9Z)-AR e interactuar con receptores RAR/RXR. La presente invención demuestra que estos últimos dos isómeros son tan activos como (13Z)-AR en la prevención de la proliferación en células JMML, soportando esta suposición. Para demostrar las rutas mediadas por RAR/RXR, se investigó la capacidad de los retinoides selectivos de los receptores para evitar la proliferación de células JMML. La alta actividad de (*todo-E*)-UAB8 en este ensayo de JMML *in vitro* y la actividad reducida de o (9Z)-UAB8 o (9Z)-

UAB30, dos retinoides selectivos de RXR, son consistentes con una ruta mediada por RAR de trans-represión. (*Todo-E*)-UAB30 es menos activo que los otros isómeros AR naturales y (*todo-E*)-UAB8. Puesto que se une bien a cada subtipo RAR, pero no activa la transcripción para antagonista de RAR α , esta menor actividad en el ensayo de JMML *in vitro* en relación con (*todo-E*)-UAB8 puede ser debida a su antagonismo de RAR α o en otras palabras, falta de antagonismo de AP-1. La unión de ligando es una condición necesaria pero no suficiente para antagonismo de AP-1. Esta no es una propiedad inusual de los retinoides, puesto que se han identificado retinoides que son antagonistas de RAR α pero no inducen la trans-represión mediada por RAR de transcripción mediada por AP-1 (26).

Ejemplo 21

Prevención de Cáncer por Retinoides UAB

Se determinó la eficacia de (9Z)-UAB30 en tumores malignos de mama inducidos por metilnitrosourea (MNU). La Tabla 5 y la Figura 10 muestran la comparación entre dos grupos de ratas de peso de tumor promedio/rata durante un periodo de tiempo post-inducción con MNU. La Tabla 6 y la Figura 11 muestran la comparación entre los mismos dos grupos de ratas del peso corporal promedio/rata medido en días diferentes. Los datos demuestran que el tratamiento de UAB-30 inhibió el crecimiento de los tumores malignos de mama inducidos por MNU, mientras no presentaban efectos evidentes para el crecimiento del cuerpo total.

TABLA 5

Días post MNU	Grupo 17	Grupo 29
26	0	0,05
33	0	0,05
40	0,05	0,10
47	0,20	0,30
54	0,40	0,45
61	1,15	0,55
68	1,70	0,55
75	2,00	0,55
82	2,60	0,70
89	3,05	0,90
96	3,35	1,00
103	3,90	1,35
110	5,15	1,75
117	5,55	2,00
124	5,65	2,20
131	5,75	2,35

Grupo 17 - Teklad (4%)/MNU

Grupo 29 – UAB-30 (200 mg/kg)/MNU

ES 2 347 739 T3

TABLA 6

	Días de Edad	Grupo 17	Grupo 29
5	43	133	133
	57	162	158
10	64	176	174
	71	190	188
	78	200	197
15	85	207	203
	92	214	210
	99	213	211
20	106	216	215
	113	218	216
25	120	219	218
	127	225	223
	134	227	227
30	141	232	236
	149	234	234
	155	235	236
35	162	236	238
	169	235	242
40	176	234	243
	183	235	244

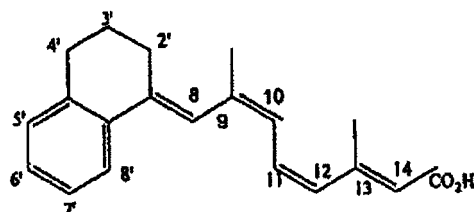
Grupo 17 - Teklad (4%)/MNU

Grupo 29 – UAB-30 (200 mg/kg)/MNU

Ejemplo 22

Ejemplo de Compuestos Relacionados con UAB30

Se enumeran a continuación ejemplos de compuestos sintetizados que se relacionan con UAB30 con datos analíticos:



ES 2 347 739 T3

	<u>UAB Número</u>	<u>Sustituyente(s)</u>
	(9Z)-UAB30	H
5	(9Z)-UAB31	5'-metoxi
	(9Z)-UAB32	6'-metoxi
	(9Z)-UAB33	7'-metoxi
10	(todo-E)-UAB33	7'-metoxi
	(9Z)-UAB34	4'-metilo
15	(9Z)-UAB35	5',7'-dimetilo
	<u>(9Z)-UAB31</u>	
20	RMN de ^1H : (t) 1H δ 7,17 J = 7,95, (d) 1H δ 6,77 J = 7,96, (dd) 1H δ 6,67 J = 11,10; 4,06, (s) 1H δ 6,46, (d) 1H δ 6,25 J = 15,34, (d) 1H δ 6,12 J = 11,0; (s) 1H δ 5,76, (t) 2H δ 2,75 J = 6,30, (t) 2H δ 2,34, J = 5,86, (s) 3H δ 2,21; (s) 3H δ 1,98; (qui) 2H δ 1,84 J = 6,10.	
	<u>(9Z)-UAB32</u>	
25	RMN de ^1H : (d) 1H δ 7,60 J = 8,79, (m) 3H δ 6,79-6,65, (s) 1H δ 6,36, (d) 1H δ 6,25 J = 15,32, (d) 1H δ 6,10 J = 10,94, (s) 1H δ 5,77, (s) 3H δ 3,81, (t) 2H δ 2,83 J = 6,20, (t) 2H δ 2,38 J = 6,05, (s) 3H δ 2,23, (s) 3H δ 1,98, (qui) 2H δ 1,82 J = 6,1.	
30	<u>(9Z)-UAB33</u>	
35	RMN de ^1H : (d) 1H δ 7,16 J = 2,54, (d) δ 7,06 J = 8,40, (dd) 1H δ 6,80 J = 2,56, J = 5,81, (dd) 1H δ 6,68 J = 4,24, J = 11,02, (s) 1H δ 6,45, (d) 1H δ 6,26, J = 15,32, (d) 1H δ 6,13 J = 10,85, (t) 2H δ 2,79 J = 6,20, (t) 2H δ 2,38 J = 5,20, (s) 3H δ 1,98, (qui) 2H δ 1,81 J = 6,17.	
	RMN de ^{13}C (CDCl_3): δ 172,10; 158,27; 155,90; 141,60; 138,71; 136,92; 134,29; 134,18; 130,69; 130,57; 127,82; 122,98; 117,81; 114,59; 109,34; 55,80; 29,81; 28,92; 25,12; 24,45; 14,46.	
40	UV-VIS: $I_{\text{max}} = 332 \text{ nm}$, $e = 19.838$	
	<u>(todo-E)-UAB33</u>	
45	RMN de ^1H : (dd) 1H δ 7,58 J = 3,73; 1,84, (m) 4H δ 7,20-6,97, (s) 1H δ 6,51 (d) 1H δ 6,33, J = 15,05, (d) 1H δ 6,25 J = 11,4; (s) 1H δ 5,82, (m) 4H δ 2,83-2,76, (s) 3H δ 2,39, (s) 3H δ 2,09, (qui) 2H δ 1,85, J = 6,27.	
	<u>(9Z)-UAB34</u>	
50	RMN de ^1H : (d) 1H δ 7,63 J = 7,29, (m) 4H δ 7,26-7,17, (m) 1H δ 6,74-6,66, (s) 1H δ 6,46, (d) 1H δ 6,26 J = 15,35, (d) 1H δ 6,13 J = 15,35, (s) 1H δ 5,77, (m) 2H δ 3,00-2,92, (m) 1H δ 2,54-2,30, (s) 3H δ 2,23, (s) 3H δ 1,99, (m) 2H δ 1,64-1,54, (d) 3H δ 1,30 J = 6,98.	
55	<u>(9Z)-UAB35</u>	
60	RMN de ^1H : (s) 1H δ 7,33, (s) 1H δ 6,95, (dd) 1H δ 6,68 J = 4,23 J = 11,04, (s) 1H δ 6,41, (d) 1H δ 6,25 J = 15,33, (d) 1H δ 6,12 J = 10,98, (s) 1H δ 5,76, (t) 2H δ 2,68 J = 6,36, (s) 3H δ 2,32, (m) δ 2,36-2,27, (s) 3H δ 2,22, (s) 3H δ 1,97, (qui) 2H δ 1,85, J = 6,24.	
	RMN de ^{13}C (CDCl_3):	
65	<u>(9Z)-UAB40</u>	
	RMN de ^1H (DMSO): (s) 1H δ 12,03, (m) 4H δ 7,23-7,05, (d) 1H δ 6,37 J = 15,40, (d) 1H δ 6,18, J = 11,51, (s) 1H δ 6,07 (s) 1H δ 5,78, (s) 2H δ 2,74, (s) 2H δ 2,30, (s) 3H δ 2,20, (s) 3H δ 2,00, (s) 4H δ 1,66.	

Como conclusión, la presente invención muestra que la sustitución de un anillo de bencilo condensado por grupos alquilo tiene poco efecto en la conformación en la cadena de polieno entre C-8 y C-15, pero cambia mucho las propiedades biológicas de los retinoides UAB restringidos conformacionalmente. En particular, los perfiles transcripcionales de los receptores nucleares de isómeros *todo-E* se modifican espectacularmente. Para UAB30, este isómero muestra selectivamente activación de la transcripción mediada por RAR β y RAR γ (un antagonista RAR α), mientras (*todo-E*)-UAB8 es un potente agonista *pan*-RAR. Los perfiles transactivacionales de los isómeros 9Z son muy similares; tanto los isómeros (9Z) de UAB8 como UAB30 son compuestos selectivos de RXR α , mostrando los últimos la mayor potencia y selectividad. Estos retinoides también presentan eficacias muy diferentes en diversos ensayos biológicos y los cambios en sus actividades se correlacionan bien con sus propiedades transcripcionales individuales. Por ejemplo, la alta actividad de (*todo-E*)-UAB8 sobre (*todo-E*)-UAB30 y (9Z)-UAB8/(9Z)-UAB30 en la prevención de papilomas de piel, en la inhibición de la proliferación de células JMML es consistente con su demostrada potente actividad para activar la expresión génica mediada por cada subtipo RAR y/o su actividad putativa para reprimir la expresión génica de AP-1 por subtipos RAR. Un aspecto excitante del presente trabajo es la mayor eficacia de (*todo-E*)- y (13Z)-UAB8 sobre (*todo-E*)-AR en su capacidad para diferenciar células NB4. El isómero *todo-E* de UAB8 es 2 veces menos tóxico que este isómero de AR 929) y su plasma durante tiempos prolongados. Tomados juntos, estos dos isómeros de UAB8 y análogos pueden ser agentes mejorados para uso clínico en el tratamiento de pacientes de APL.

Además, la presente invención muestra que el uso de un potente RAR α , todo-trans-UAB8 junto con un agonista selectivo de RXR, 9-cis-UAB30, mejora significativamente la diferenciación de células NB4. Cuando se compara con ATRA solo, esta combinación es 30 veces más eficaz en la diferenciación de células NB4. Los datos de toxicidad *in vivo* en todo-trans-UAB8 indica que es menos tóxico que ATRA (Lin *et al.*, 1.996, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139: 310) y los datos preliminares en 9-cis-UAB30 muestran que es mucho menos tóxico que el ácido 9-cis-retinoico. Tomados junto con la estabilidad mejorada de los retinoides UAB30, estos datos sugieren que se puede obtener un tratamiento mejorado de APL cuando estos agentes se usan combinados.

Las siguientes referencias se citaron en la presente memoria.

(1) **Rosen, J., et al.**, *J. Med. Chem.* 38: 4.855-4.874. (1.995)

(2) (a) **Mangelsdorf, et al.**, In the Retinoids Biology, Chemistry and Medicine; 2^a ed., Raven Press: Nueva York, págs. 319-349, (1.994) (b) **Gudas, L.**, *J. Biol. Chem.* 269: 15.399-15.402. (1.994)

(3) **Nadzan, A. M.**, *Annu Rev. Med. Chem.* 30: 119-128 (1.995)

(4) **Degos, L., et al.**, *Blood* 85: 2.643-2.653. (1.995)

(5) **Caetleberry, R. et al.**, *N. Engl. J. Med.* 331: 1.680-1.684 (1.994)

(6) **Emanuel, P. D., et al.**, *Mol. Med. Today* 2: 468-475. (1.996)

(7) **Muccio, D. D., et al.**, Patente de EE.UU. 5.094.783, 10 de marzo de 1.992.

(8) **Muccio, D. D., et al.**, *J. Med. Chem.*, 39: 3.625-3.635. (1.996)

(9) **Alam, M., et al.**, *J. Med. Chem.* 38; 2.303-2.310. (1.995)

(10) **Vaezi, M. F., et al.**, *J. Med. Chem.* 37; 4.499-4.507. (1.994)

(11) **Vaezi, M. F., et al.**, *Org. Prep. Proc. Int.* 19: 187-195. (1.987)

(12) **Hale, et al.**, *Labeled Compds. Radiopharm.* 13: 123-135 (1.977)

(13) **Zhang, X-K.**, *Naturel* 355: 441-446 (1.992)

(14) **Verma, A., et al.**, *Cancer Res.* 37: 2.196-2.201. (1.977)

(15) (a) **Breitman, T. R., et al.**, *Methods Enzymol.* 190: 118-130 (1.990). (b) **Tiarni, M., et al.**, *Exp. Cell Res.* 230: 69-75. (1.997)

(16) (a) **Emanuel, P. D., et al.**, *Exp. Hematol.* 19: 1.017-1.024. (1.991). (b) **Emanuel, P., et al.**, *Blood* 77: 925-929. (1.991)

(17) **Lake, C. H., et al.**, *J. Chem. Crystallogr* 27: 231-235. (1.997)

(18) (a) **Sanl, B. P., et al.**, *Biochem. J.* 171: 711-717 (1.978). (b) **Sani, B. P.**, In Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids; Dawson, M. L., Okamuar, W. H., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, págs. 365-384 (1.990)

(19) **Graupner, G., et al.**, *Nature* (Londres) 340: 653-656 (1.989)

ES 2 347 739 T3

(20) (a) **Chandraratna**, R.A.S., *et al.*, *BioMed. Chem. Lett.* 5: 523-527 (1.995). (b) **Nagpal**, S., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 923-927 (1.995)

(21) **Castleberry**, R. P., *et al.*, *Blood* 78 (Supl.1), 170a (1.991)

(22) (a) **Lapidot**, T., *et al.*, *Blood* 82 (Supl. 1), 197a (1.993) (b) **Cambier** N., *et al.*, *Blood* 86 (Supl. 1), 791a (1.995)

(23) **Emanuel**, P. D., *et al.*, *Blood* (Supl. 1), 728a (1.995)

(24) (a) **Yang Yen**, H-F., *et al.*, *New Biol.* 3; 1.206-1.219. (1.991)

(25) **Salbert**, G., *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 7: 1.347-1.356 (1.993)

(25) (a) **Fanjul**, A., *et al.*, *Nature* 372: 107-111. (1.994). (b) **Nagpal**, S., *J. Biol. Chem.* 270: 923-927. (1.995)

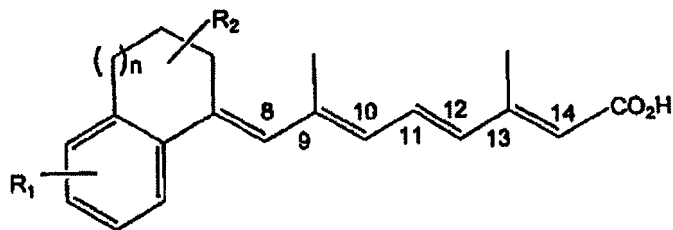
(27) (a) **Kizaki**, M., *et al.*, *Blood* 83: 3.289-3.297. (1.994). (b) **Kizaki**, *et al.*, *Blood* 87: 1.977-1.984 (1.996)

(28) **Chen.**, J.-Y., *Nature* 382: 819-822. (1.996)

(29) **Lin**, T.-H., *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139: 310-316. (1.996)

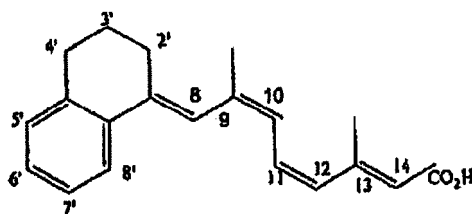
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto retinoide que es un isómero 9(Z) o un *todo(E)* con la estructura:



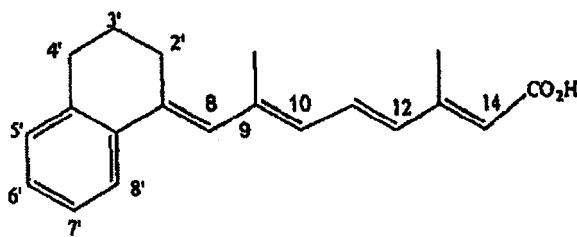
en la que R_1 es fenilo, bencilo, alquilo cíclico C_3-C_8 , arilo o arilalquilo; R_2 es hidrógeno, etilo, metilo, n-propilo o isopropilo y n es de 0 a 3.

2. El compuesto retinoide que es un isómero 9(Z) con la estructura:



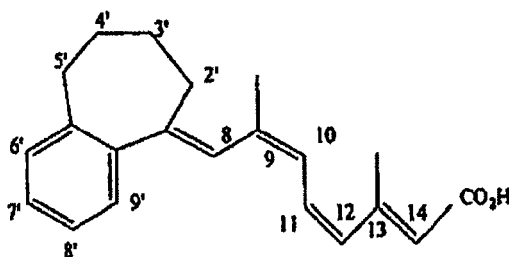
en la que el hidrógeno está en el anillo arílico o un grupo metoxi está en la posición 5', 6' ó 7' en el anillo arílico o un grupo metilo está en la posición 4' en el anillo cicloalquilico o un grupo metilo está en la posición tanto 5' como 7' en el anillo arílico.

3. El compuesto retinoide que es un isómero *todo(E)* con la estructura:



en el que un grupo metoxi está en la posición 7' en el anillo arílico.

4. El compuesto retinoide que es un isómero 9(Z) con la estructura:



ES 2 347 739 T3

5. El uso de uno o más de los compuestos retinoides según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la preparación de un medicamento eficaz para tratar una afección neoplásica en un individuo.

5 6. El uso según la reivindicación 5, en el que uno o más compuestos retinoides se combinan con 4-hidroxifenilretinamida.

10 7. El uso según cualquiera de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que la afección neoplásica es un cáncer de piel, un cáncer de mama, un cáncer de vejiga, un cáncer de próstata, un cáncer de pulmón, un cáncer de colon o una leucemia.

8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el medicamento es eficaz para reducir o prevenir el caso de la afección neoplásica en el individuo.

15 9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que una dosis de uno o más compuestos es aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg.

10. Una composición que comprende uno o más de los compuestos retinoides según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 4-hidroxifenilretinamida para el tratamiento de una afección neoplásica en un individuo.

20 11. Una composición según la reivindicación 10, en la que la afección neoplásica es un cáncer de piel, un cáncer de mama, un cáncer de vejiga, un cáncer de próstata, un cáncer de pulmón, un cáncer de colon o una leucemia.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

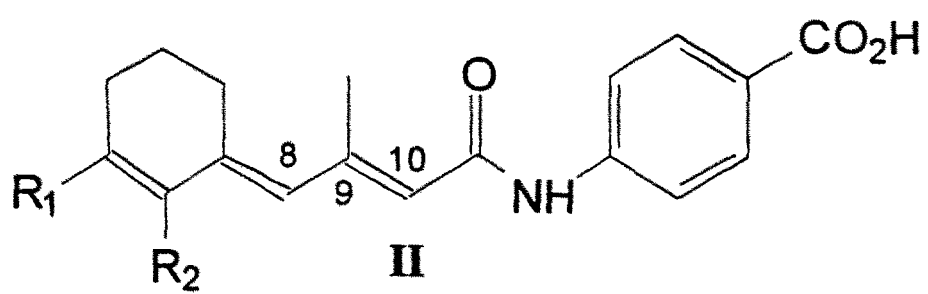
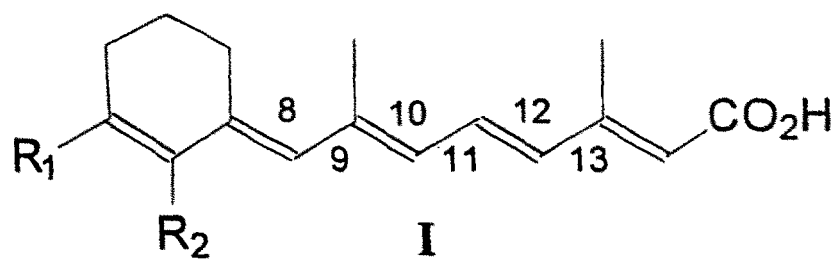


FIG. 1

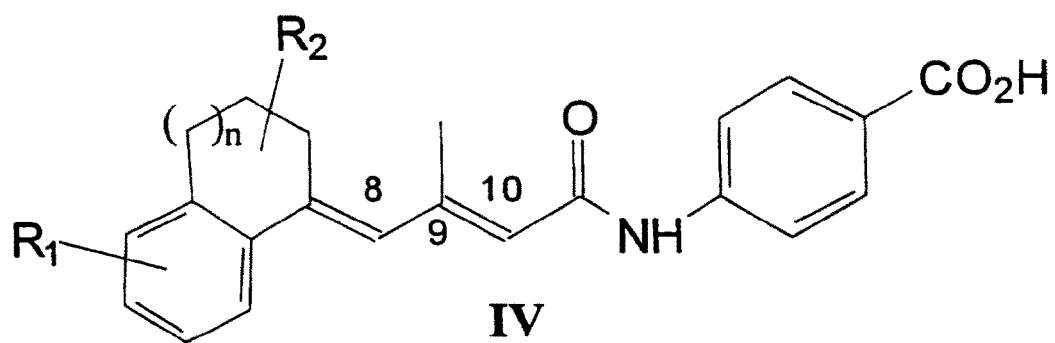
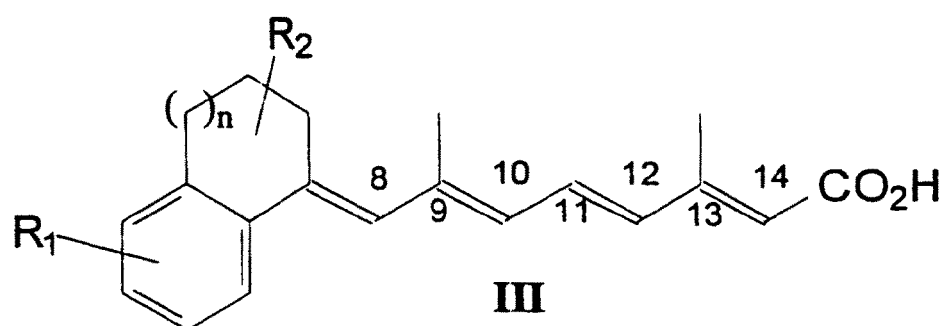


FIG. 2

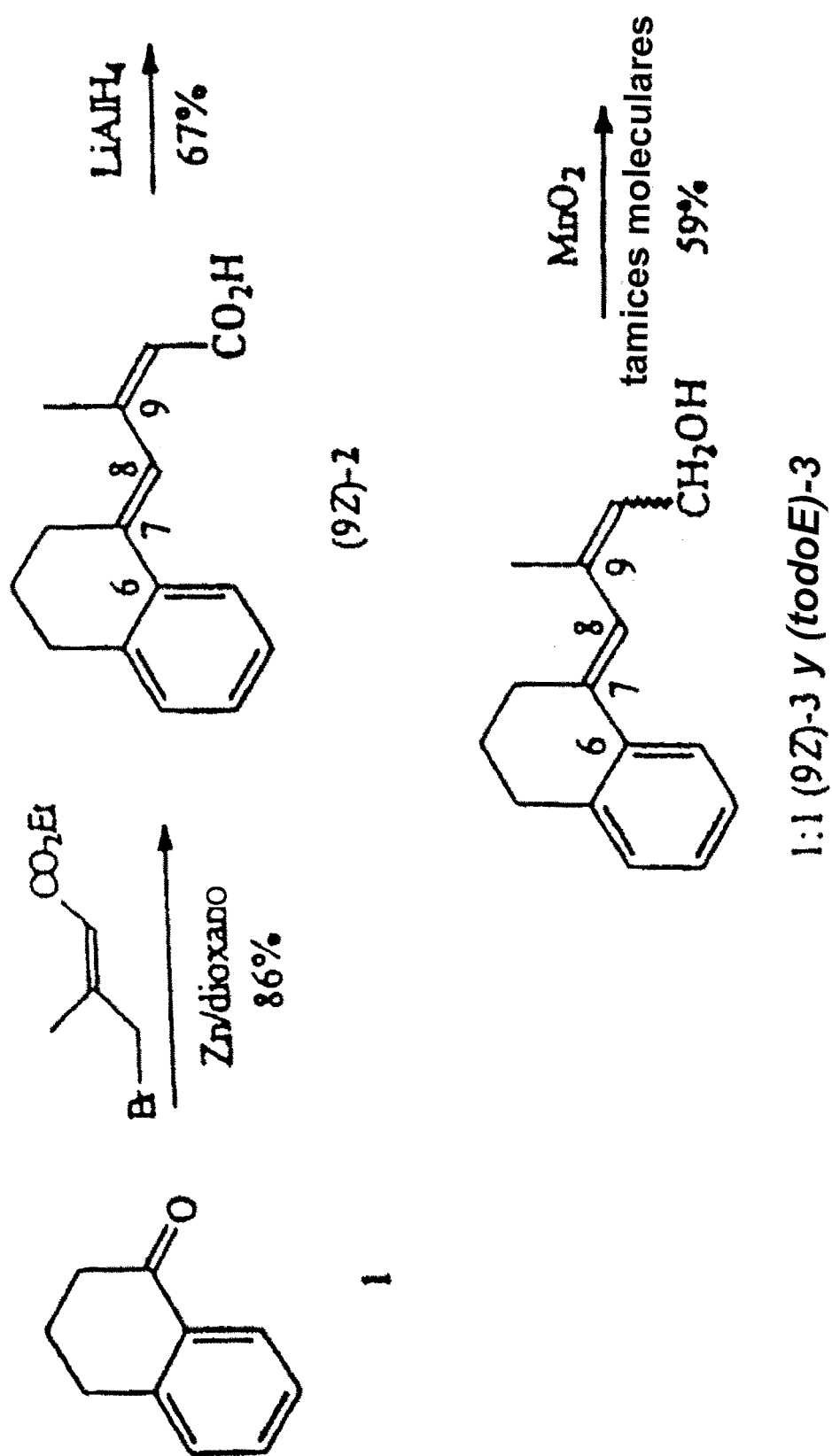


FIG. 3-1

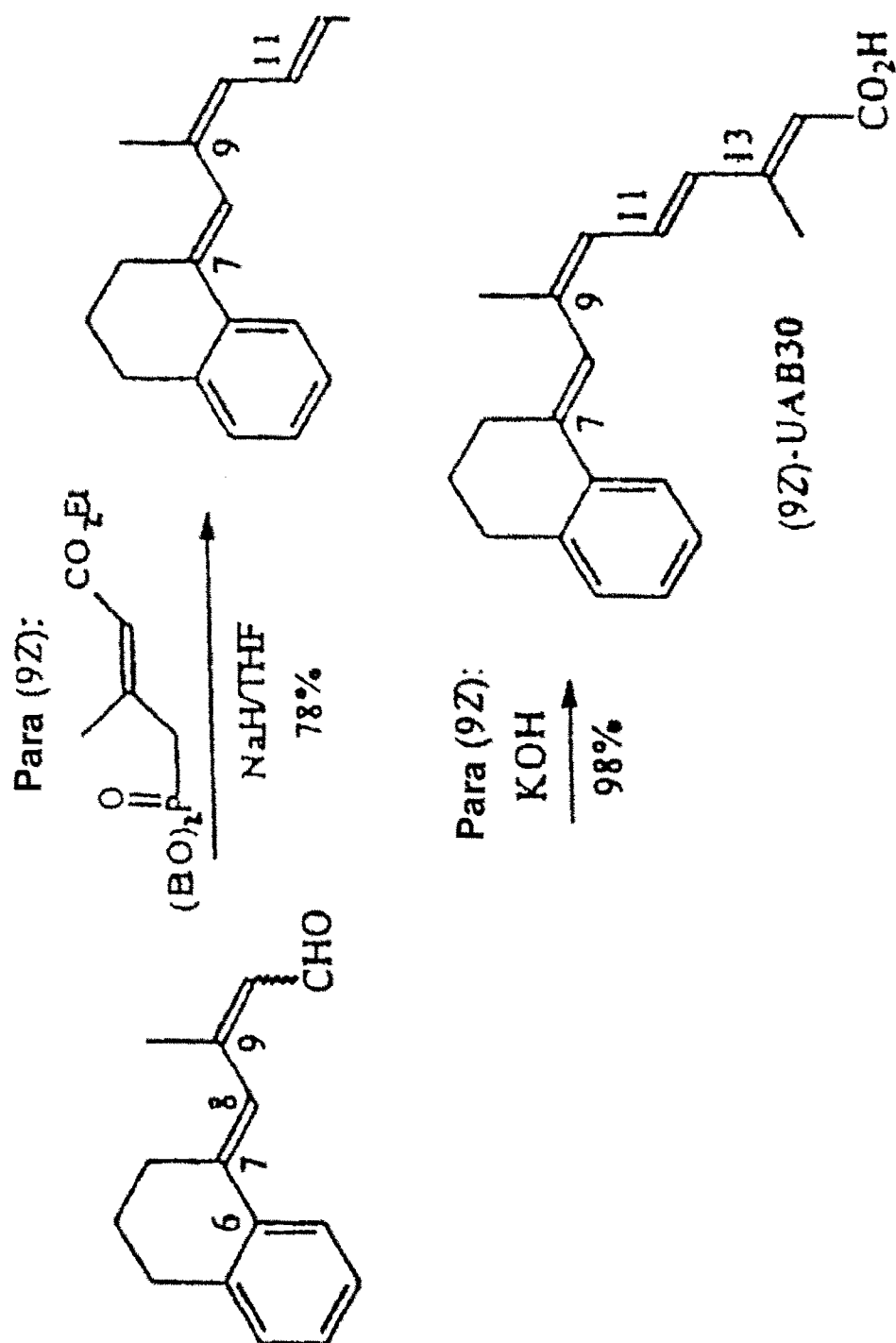
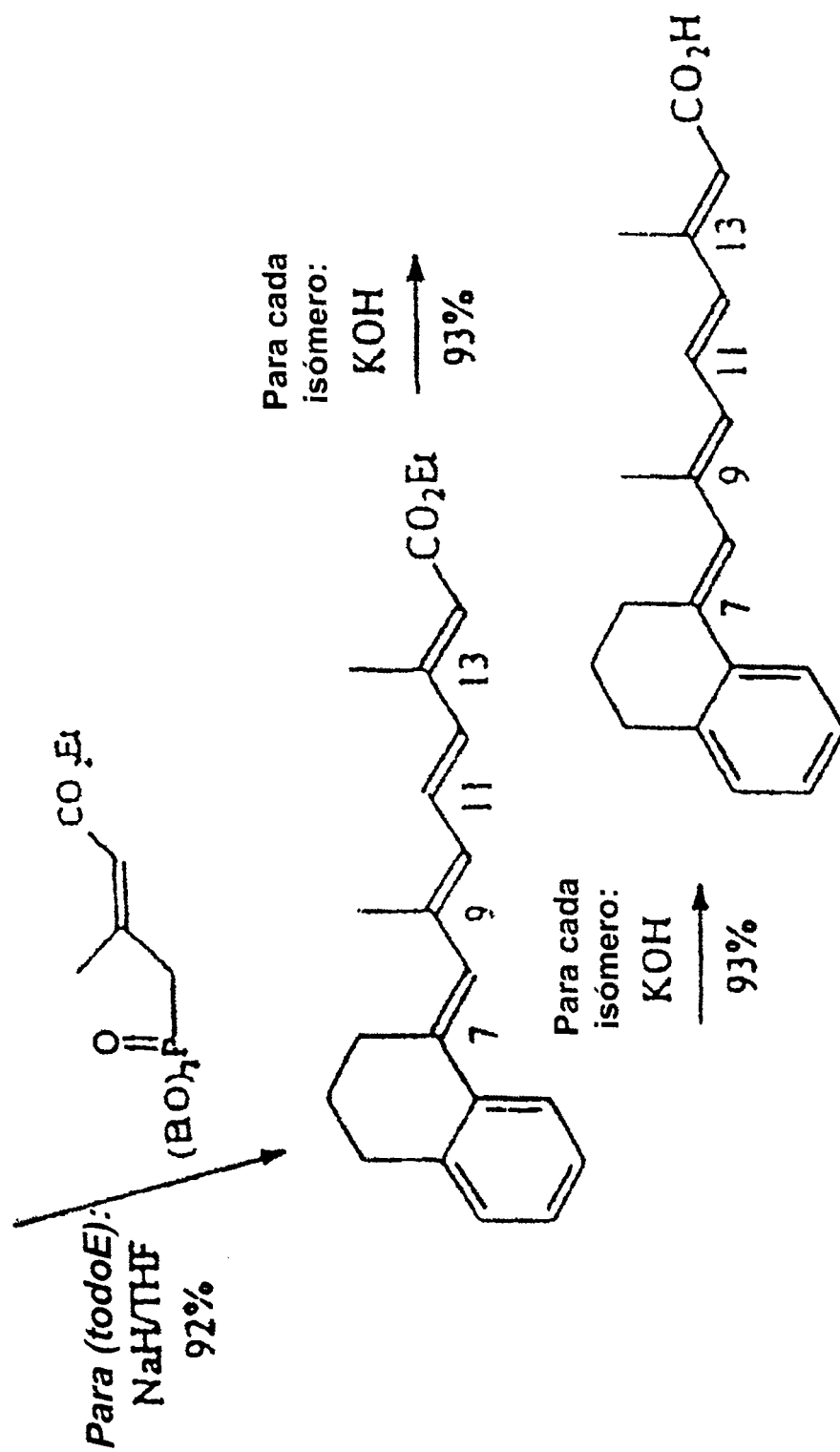


FIG. 3-2



(todo E)-UAB30 y (13Z)-UAB30

FIG. 3-3

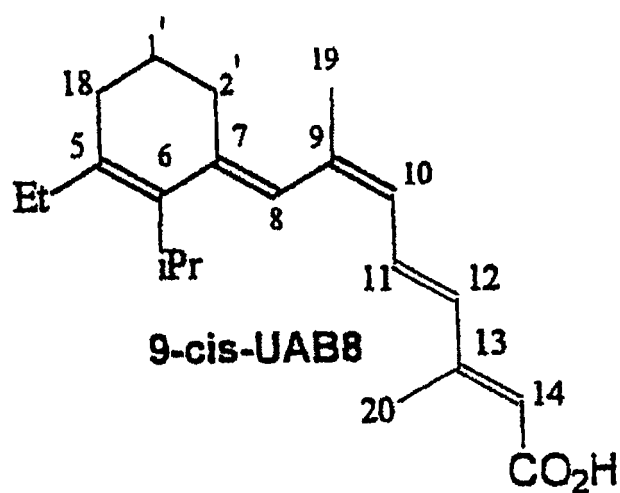
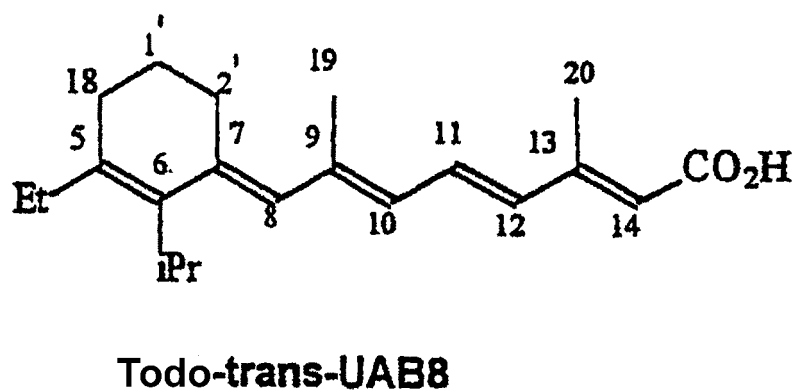
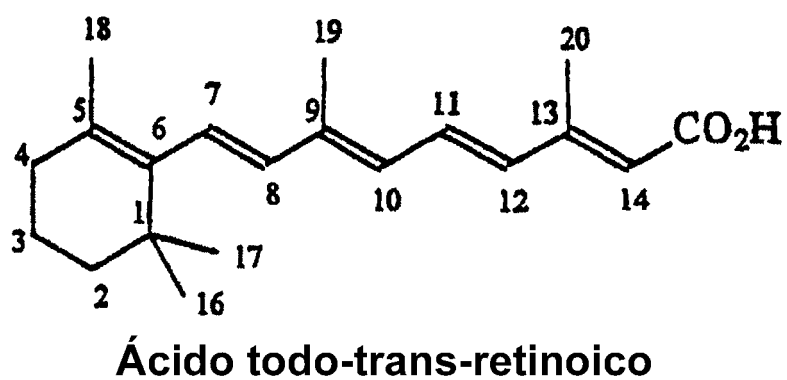
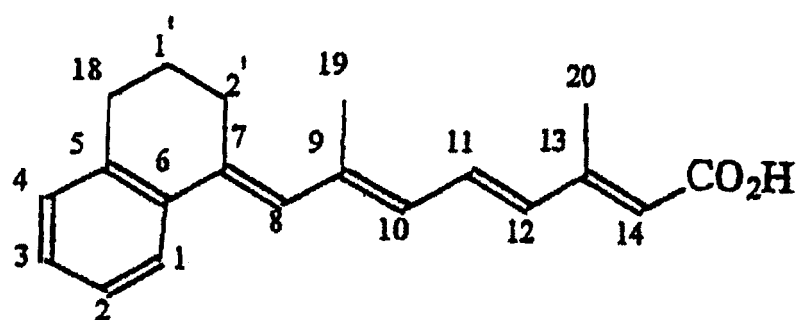
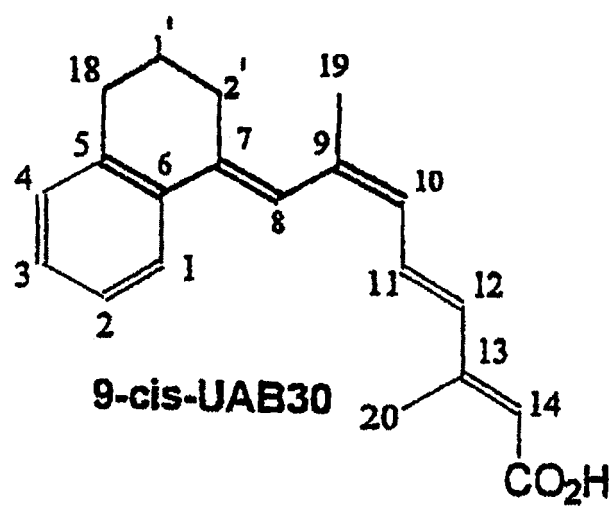


FIG. 4-1



Todo-trans-UAB30



9-cis-UAB30

FIG. 4-2

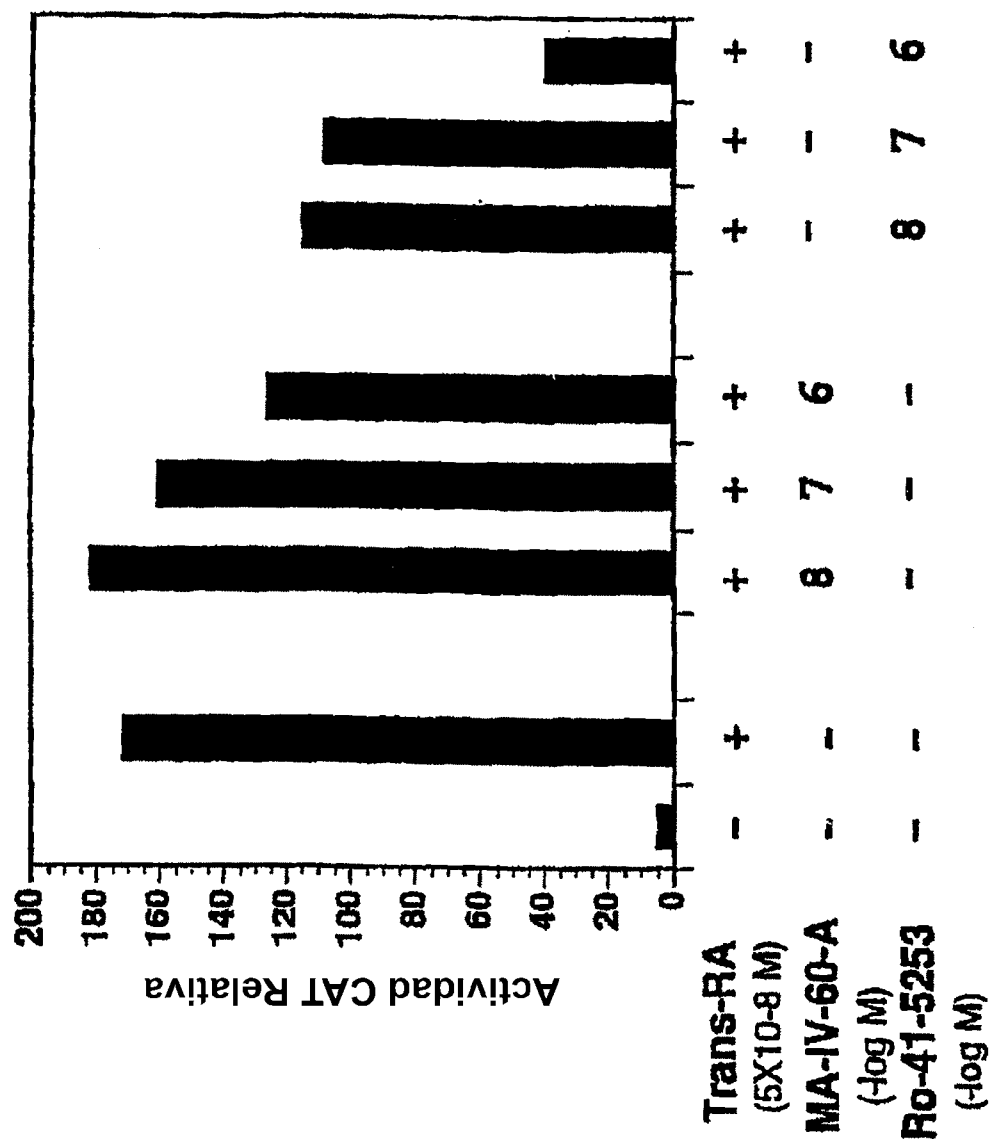
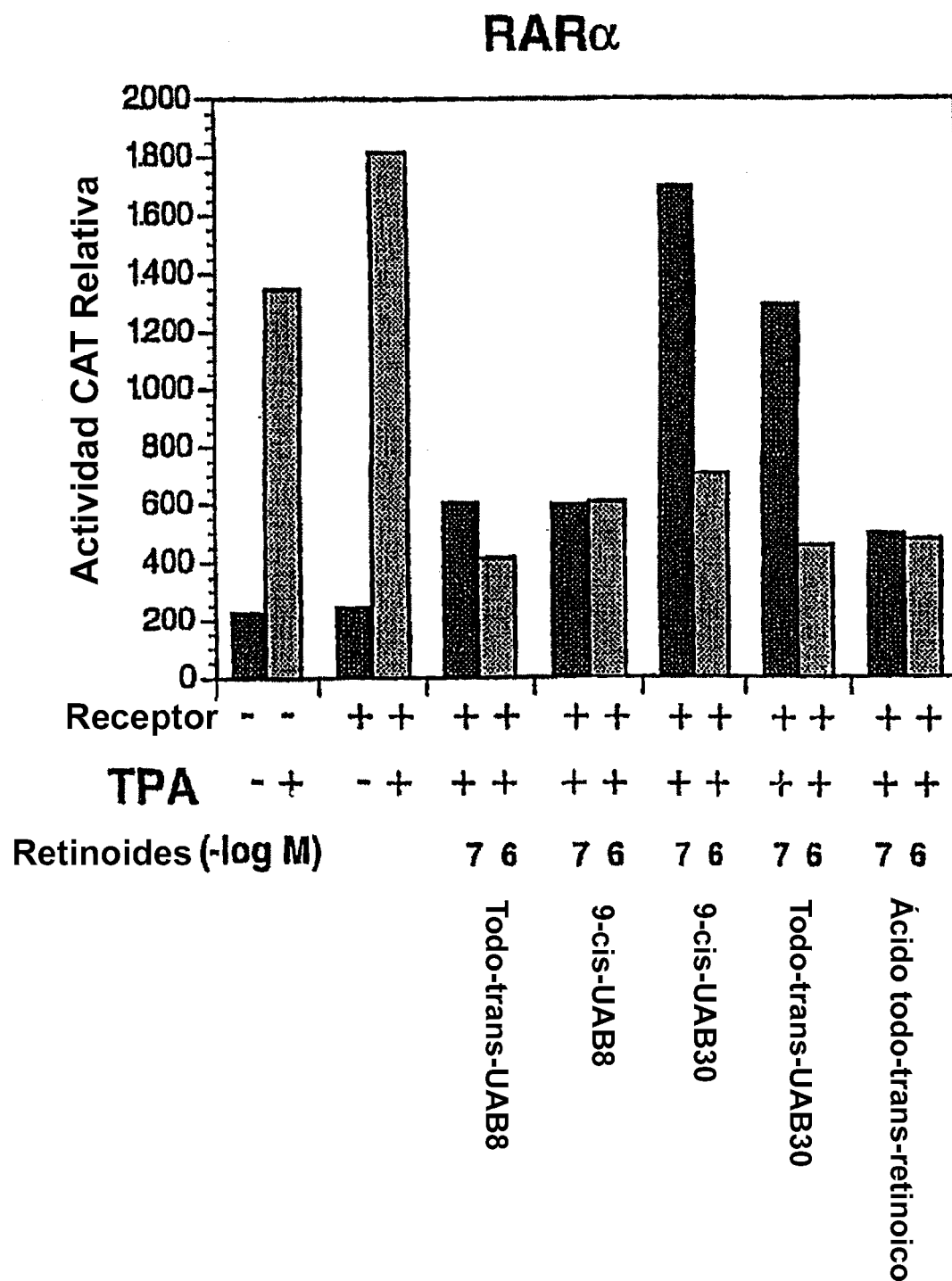


FIG. 5



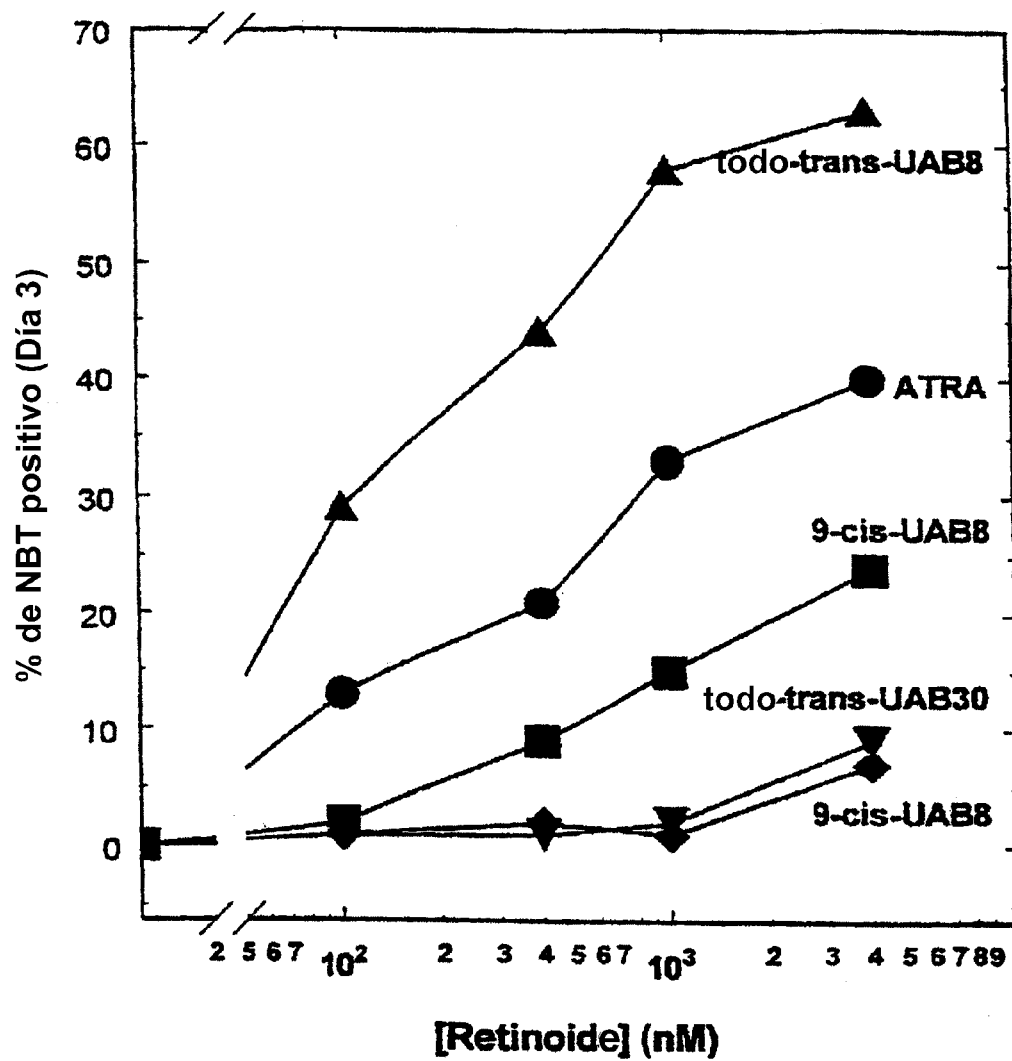
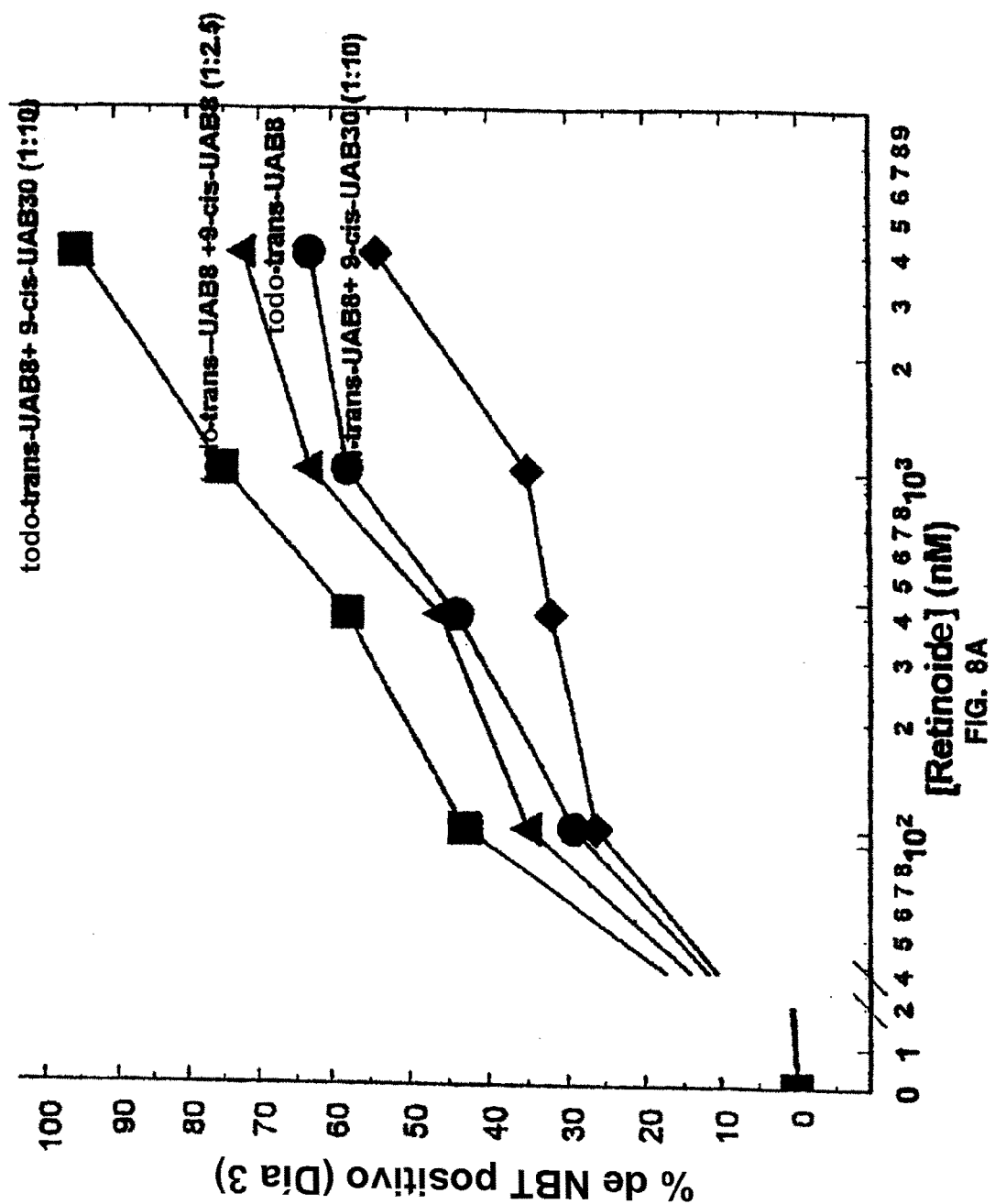


FIG. 7



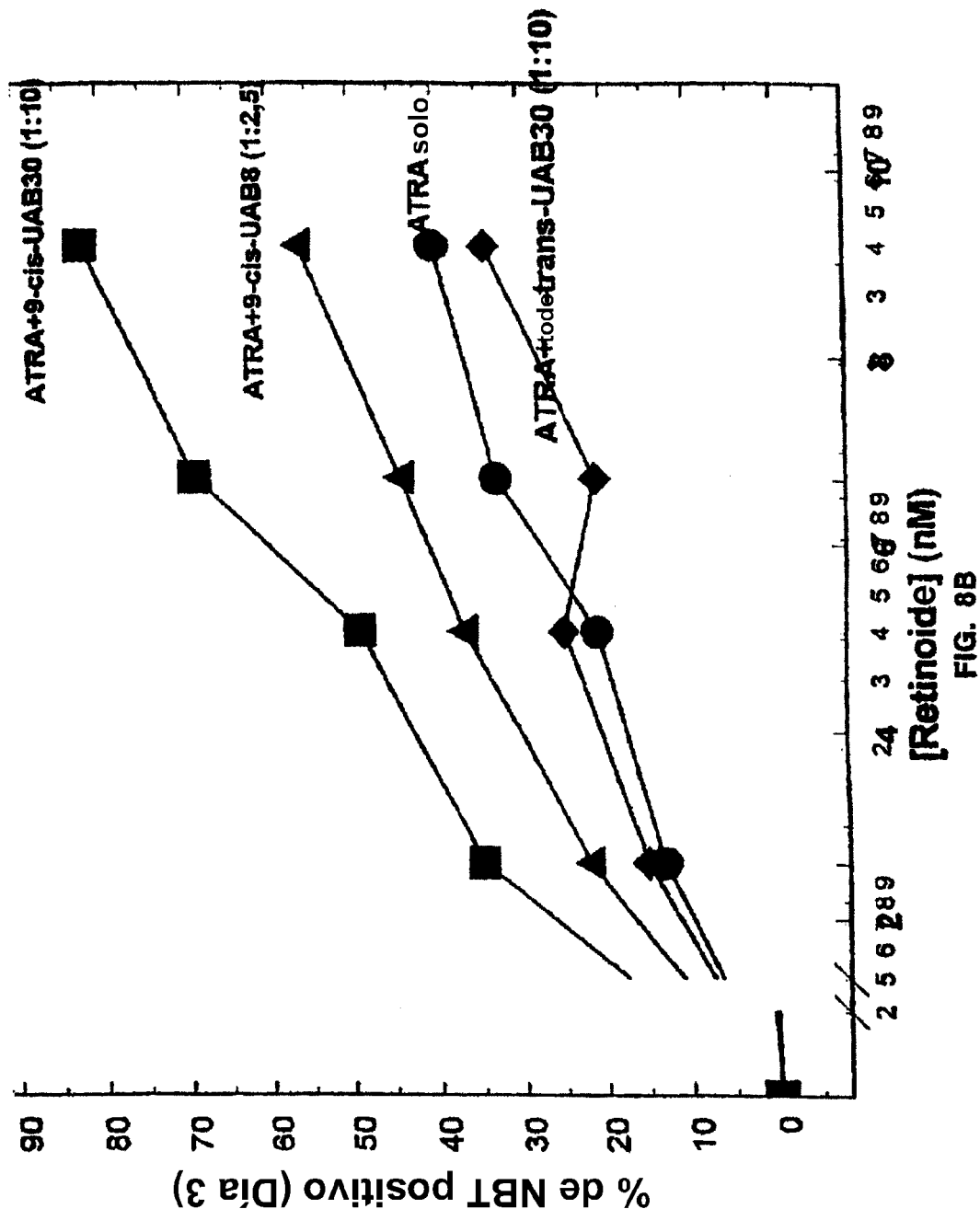


FIG. 8B

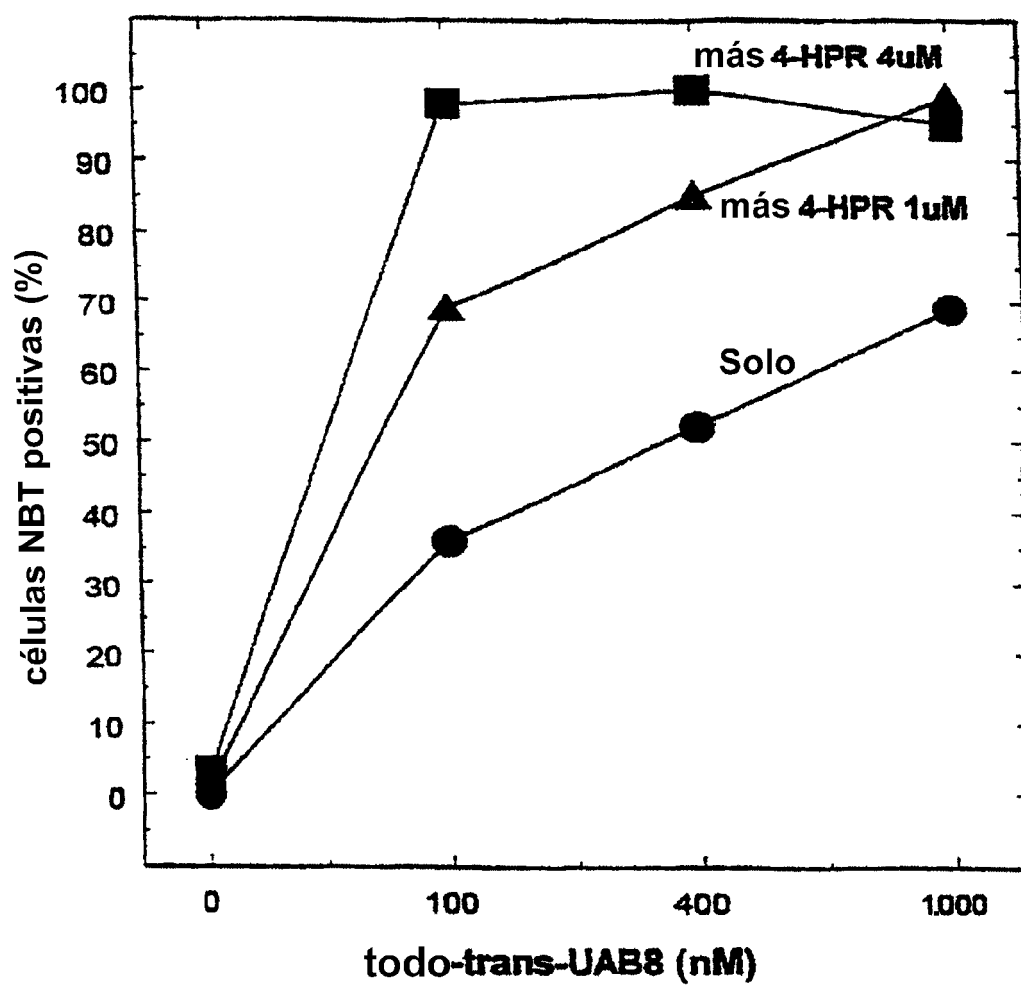


FIG. 9

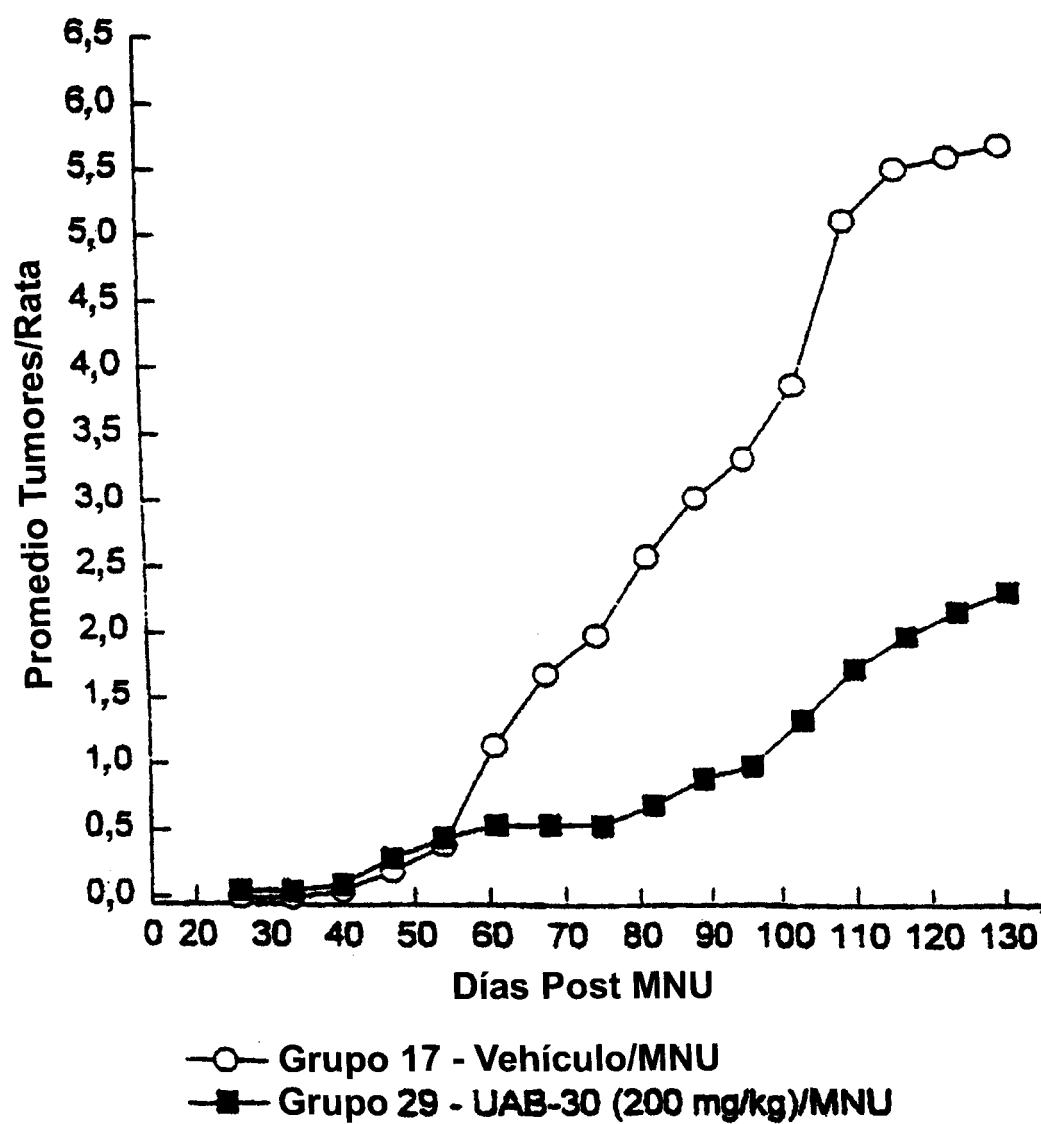


FIG. 10

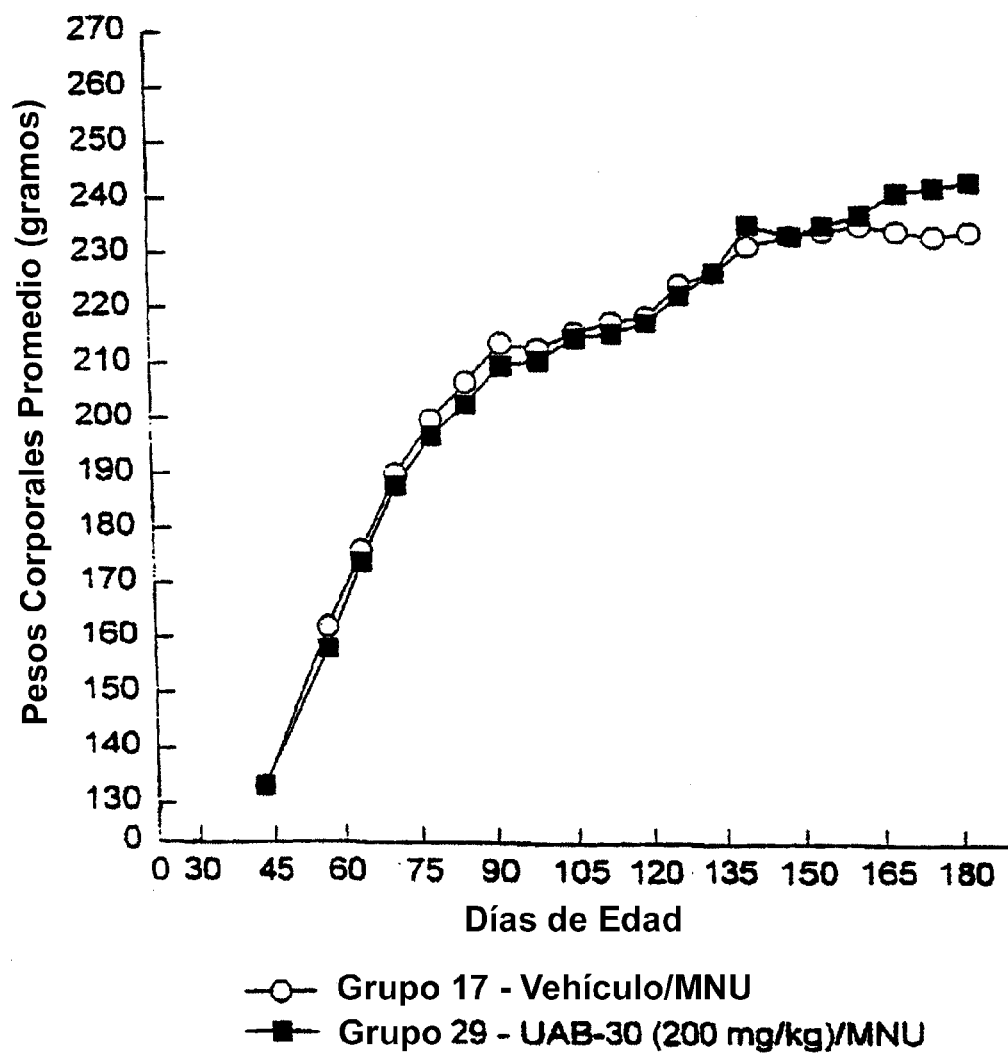


FIG. 11