



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 303 096**

(51) Int. Cl.:
A61K 31/216 (2006.01)
A61K 31/11 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04777151 .4**
(86) Fecha de presentación : **25.06.2004**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1653943**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **10.05.2006**

(54) Título: **Derivados del catecol para el tratamiento del cáncer.**

(30) Prioridad: **25.06.2003 US 482886 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2008

(73) Titular/es: **The Burnham Institute**
10901 North Torrey Pines Road
La Jolla, California 92037, US

(72) Inventor/es: **Reed, John C. y**
Pellecchia, Maurizio

(74) Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 303 096 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

Derivados del catecol para el tratamiento del cáncer.

5 Antecedentes de la invención

Actualmente hay necesidad de nuevos agentes potentes y selectivos para prevenir o tratar el cáncer, y en particular el melanoma, el cáncer de la cervix o la leucemia. Uno de los métodos que están actualmente en estudio es la inducción selectiva de la apoptosis. Hay también necesidad de herramientas farmacológicas para el adicional estudio de los procesos fisiológicos asociados a la inducción selectiva de la apoptosis.

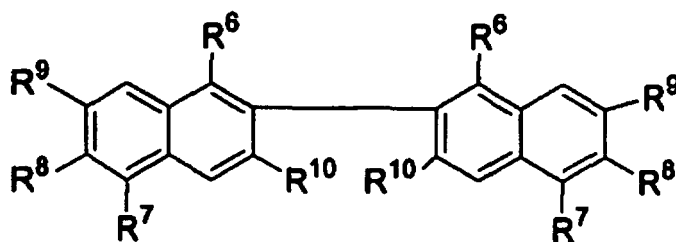
La muerte celular programada (apoptosis) es decisiva para la homeostasis tisular, para la eliminación fisiológica de las células no deseadas durante el desarrollo y en el mecanismo de defensa del huésped (Vaux y otros, *Cell*, 96:245 (1999)). La inhibición de la apoptosis está implicada en toda malignidad humana conocida. Esta inhibición les da a las células malignas una selectiva ventaja de crecimiento, permitiendo la supervivencia frente a la radiación o la quimioterapia. (Véanse Reed, *Curr. Opin. Oncol.*, 7:541 (1995), y Kelekar y otros, *Trends Cell. Biol.*, 8:324 (1998)). Se cree que las de la familia Bcl-2 de proteínas son importantes reguladores de la apoptosis; y miembros pro-supervivencia de esta familia, tales como las Bcl-x_L, contienen en la superficie un surco hidrofóbico del que se cree que permite la fijación del dominio BH3 de la pareja proapoptótica (Johnstone y otros, *Cell*, 108:153 (2002)). Se cree que esta fijación es crucial para la regulación de la apoptosis, y de hecho las proteínas pro y anti-supervivencia pueden anular mutuamente sus funciones mediante dimerización. Se cree que los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 están generalmente sobreexpresados en muchas malignidades humanas. Estas observaciones han conducido a un creciente interés en el descubrimiento de pequeñas moléculas dirigidas a las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, y principalmente a las Bcl-x_L, como potenciales agentes terapéuticos anticáncer (Wang y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:7124 (2000); Degterev y otros, *Nat. Cell Biol.*, 3:173 (2001); Tzung y otros, *Nat. Cell Biol.*, 3:183 (2001); Enyedy y otros, *J. Med. Chem.*, 44:4313 (2001)). Sin embargo, hasta ahora los compuestos propuestos no han logrado corroborar plenamente el papel de inhibidores de Bcl-x_L como potenciales agentes anticáncer (Kaneko y otros, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11:887 (2001); Chin y otros, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40:3806 (2001); Kutzki y otros, *J. Am. Chem. Soc.*, 124:11838 (2002)) debido ya sea a su deficiente actividad *in vivo* o bien a la baja afinidad *in vitro*.

Por consiguiente, hay necesidad de identificar potentes compuestos celularmente permeables para apuntar a la familia Bcl-2 de receptores tales como, por ejemplo los Bcl-x_L, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-W o Bcl-B. Hay necesidad de agonistas que puedan inhibir la fijación de BH3 a los receptores Bcl-2.

Hay adicionalmente necesidad de compuestos que sean útiles como quimiosensibilizadores en particular para los tipos de cáncer en los que las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, tales como las Bcl-x_L, Bcl-2, Mcl-1 o Bcl-B, son sobreproducidas por las células de cáncer (tales como por ejemplo linfomas, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer ovárico y leucemias).

Breve exposición de la invención

En un primer aspecto, la presente invención aporta el uso de un compuesto que tiene la fórmula (I):

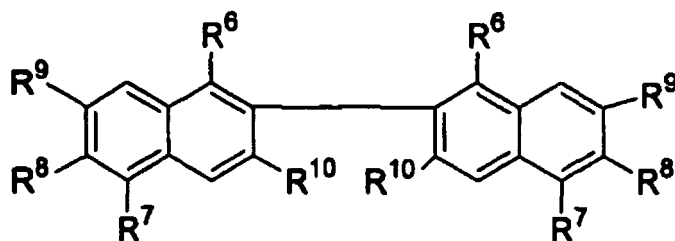


donde: cada R⁶, R⁸, R⁹ y R¹⁰ es independientemente hidrógeno, hidroxilo, -(C₁-C₆)alquilo, -(C₁-C₆)alquilhalo, -OC(O)(C₁-C₆)alquilo o halo; y cada R⁷ es independientemente hidrógeno, -(C₃-C₈)cicloalquilo, -(C₆-C₁₀)arilo o -(C₁-C₆)alquil(C₆-C₁₀)arilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un mamífero. Se exponen en las Reivindicaciones dependientes 2-7 características preferidas de este aspecto de la invención.

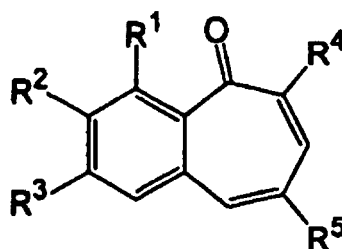
En un segundo aspecto, la presente invención aporta el uso de un agente quimiosensibilizador seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de gosisol, apogosisol, análogos de apogosisol, teaflavina, teaflavina-3'-galato, teaflavanina, (-) galocatequina-3-galato (GCG), (-) epigalocatequina-3-galato (EGCG), (-) catequina-3-galato (CG), (-) epicatequina-3-galato (ECG), análogos de purpurogalina y mezclas de los mismos, para la fabricación de un medicamento, siendo el medicamento para administración en combinación con un agente anticáncer, para tratar el cáncer en un sujeto;

donde el análogo de apogospol es un compuesto que tiene la fórmula (I):



donde: cada R^6 , R^8 , R^9 y R^{10} son independientemente hidrógeno, hidroxilo, $-(C_1-C_6)$ alquilo, $-O(C_1-C_6)$ alquilo, $-(C_1-C_6)$ alquilhalo, $-OC(O)(C_1-C_6)$ alquilo o halo; y cada R^7 es independientemente hidrógeno, $-(C_3-C_8)$ cicloalquilo, $-(C_6-C_{10})$ arilo o $-(C_1-C_6)$ alquil (C_6-C_{10}) arilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

y donde el análogo de purpurogalina es un compuesto que tiene la fórmula siguiente:



donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son como se define en la tabla siguiente:

	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
5D1	-H	-OH	-OH	-OH	$-COOOC_2H_5$
1163	-H	-OH	-OH	-OH	$-COOCH_3$
1142	-H	-OH	-OH	-OH	$-COOH$
6A1	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-H
6A7	$-OCH_3$	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	-H

Se exponen en las Reivindicaciones dependientes 9-17 características preferidas del segundo aspecto de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. *El Gosipol y la Purpurogalina compiten por la bolsa de fijación de BH3 de Bcl-x_L*. Estructura química del Gosipol (a) y de la Purpurogalina (c). Los resultados de ensayos de fijación competitiva basados en la polarización de Fluorescencia (FPA) usando un péptido Bad marcado con fluoresceína (NLWAAQRYGRELRRMSD-K(FITC)-FVD) (Synpep Corporation, Dublin, CA) se muestran en (b) para el Gosipol y en (d) para la Purpurogalina.

Figura 2. *Estudios de fijación por NMR (NMR = resonancia magnética nuclear)*. (a) espectros 2D[^{15}N , 1H]-TROSY para Bcl-x_L en las formas apo (izquierda) y fijada a Gosipol (derecha). (b) Mapeo del desplazamiento químico de Gosipol en la estructura tridimensional de Bcl-x_L en complejo con péptido Bak (Código PDB 1BXL). El péptido se muestra en amarillo. Las regiones afectadas por la fijación de Gosipol están coloreadas en rojo. (c) y (d) Experimentos de $T_{1\rho}$ (tiempo de relajación 300 msec.) con Gosipol y Purpurogalina, respectivamente: azul, sin proteína y rojo con Bcl-x_L 10 μ M. Los picos que se muestran en (c) representan a los grupos isopropilo y metilo en el Gosipol. En (d), el pico marcado con un asterisco representa al imidazol residual que está presente en la preparación de proteína.

Figura 3. *Estudios de modelación molecular*. (a) Representación superficial de Bcl-x_L con la estructura acoplada de Gosipol obtenida por FlexX. (b) Superposición de 5D1 (verde) y Gosipol (blanco con rojo para los átomos de oxígeno).

Figura 4. *El efecto inhibitorio de compuestos en la supervivencia de las células de cáncer.* Los efectos del Gosipol en la viabilidad de células tumorales en cultivo fueron verificados usando ensayos XTT con las líneas celulares (a) MCF7 y (b) ZR75-1 (círculos en negro). Como control negativo fue también sometido a ensayo un compuesto polifenólico genérico (círculos en blanco). Células HeLa de pocos pases (de un número de pases de entre 10 y 20) fueron transfectedas con los plásmidos pcDNA3-Bcl-x_L (círculos en negro) o pcDNA3 de control (círculos en blanco). (c) El análisis Immunoblot confirmó la sobreexpresión de Bcl-x_L en las células transfectedas con compuesto pcDNA3-Bcl-x_L frente a los transfectantes de control con pcDNA3. (Los lisados celulares fueron normalizados para el contenido de proteína total; 25 µg por carril). (d) Las transfectantes HeLa fueron tratadas con varias dosis de Gosipol (0, 1, 3, 10 y 100 µM). Los datos indicados representan la media ± la desviación estándar (n = 4).

La Figura 5 ilustra la actividad del Apogospol (6C1) y del Gosipol como agente único en la CLL (CLL = leucemia linfocítica crónica) recién diagnosticada y no tratada anteriormente.

La Figura 6 ilustra el efecto aditivo de Apogospol (6C1) y fludarabina (F-ara-A).

La Figura 7 ilustra el Efecto sinérgico del Apogospol (6C1) con F-ara-A.

La Figura 8 ilustra la fijación de (-)EGCG al receptor Bcl-x_L;

(a) Experimentos de T_{1ρ} (tiempo de relajación 200 msec.) con (-)EGCG antes (espectro superior) y después de la adición de Bcl-x_L 10 µM (espectro inferior). Los picos que se ven en (a) representan a los protones 4α y 4β del grupo catequina, y el *indica DMSO;

(b) Resultados del ensayo de fijación competitiva basado en la Polarización de Fluorescencia para (-)EGCG; y

(c) Representación superficial de Bcl-x_L con la estructura acoplada de (-)EGCG obtenida mediante FlexX, estando indicadas las tres subbolsas (P1, P2 y P3) ocupadas por el ligando.

La Figura 9 ilustra una comparación entre (-)CG y (-)C;

(a) Experimentos de T_{1ρ} (tiempo de relajación 200 msec.) de (-)CG (lado izquierdo) y (-)C (lado derecho); los espectros registrados en ausencia de proteína están indicados en azul; *indica imidazol del tampón de proteína;

(b) Superposición de los resultados de FPA para (-)CG y (-)C; y

(c) Representación superficial de la bolsa de fijación de Bcl-x_L con las estructuras acopladas de (-)CG (en rojo) y (-)C (en azul).

La Figura 10 ilustra la fijación de Teaflavina-3'-galato al receptor Bcl-x_L;

(a) Espectros 2D[¹⁵N, ¹H]-TROSY para Bcl-x_L (0,250 mM) antes (izquierda) y después de la adición de teaflavina-3' galato (1 mM) (derecha);

(b) Resultados de FPA para teaflavina-3' galato; y

(c) Representación superficial de la bolsa de fijación de Bcl-x_L con la estructura acoplada de teaflavina-3' galato; estando encerradas en un círculo las tres subbolsas (P1, P2 y P3) ocupadas por el ligando.

La Figura 11 ilustra la inhibición de Bcl-x_L usando las Teaflavinas que se muestran.

La Figura 12 ilustra la inhibición de Bcl-x_L usando Teaflavina.

La Figura 13 ilustra el efecto de la Teaflavina en las células Hela en un ensayo XTT.

Descripción detallada

Los compuestos que están destinados a ser usados en la presente invención son útiles para antagonizar a los receptores de las proteínas Bcl-2 (tales como, por ejemplo, las Bcl-2 y Bcl-x_L). Estas proteínas pueden hacer a las células de cáncer más resistentes al tratamiento anticáncer normal tal como, por ejemplo, la radiación o la quimioterapia. Así, estas células no mueren y pueden proliferar. La inhibición de tales proteínas por parte de los compuestos que aquí se describen reduciría o eliminaría la resistencia de las células al tratamiento anticáncer. Por consiguiente, estos compuestos son útiles como quimiosensibilizadores. Así, los compuestos que están destinados a ser usados en la invención pueden hacer que las células de cáncer devengan más sensibles al tratamiento anticáncer tal como, por ejemplo, la radiación o la quimioterapia. Así, los compuestos que están destinados a ser usados en la presente invención son útiles para modular la formación de complejos entre las proteínas Bcl-2 y el dominio BH3 de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 y para modelar la cantidad de estabilidad de estos complejos.

En el curso del proceso de idear la presente invención fueron sometidos a ensayos polifenoles de té verde y té negro. El té verde se hace a partir de las hojas no fermentadas de *Camelia Sinensis*, y los polifenoles - conocidos como catequinas - constituyen sus principales componentes químicos. Las principales catequinas que están contenidas en el té verde son la epicatequina (EC), la epicatequina-3 galato (ECG), la epigallocatequina (EGC) y la epigallocatequina-3 galato (Tabla 1) (Chu y otros, en: Yamamoto, T., Juneja, J.R., Cu, D.C. y Kim, M. Chemistry and Application of Green Tea, pp. 13-22, Nueva York: CRC Press, 1997). El té negro se hace mediante extensiva oxidación enzimática de los polifenoles para su conversión en productos polimerizados tales como teaflavinas (Pan y otros). Las principales teaflavinas en el té negro son la teaflavina, la teaflavina-3 galato, la teaflavina-3' galato y la teaflavina-3-3' digalato.

Se usan las definiciones que se indican a continuación, a no ser que se describa otra cosa: halo es fluoro, cloro, bromo o yodo. Alquilo, alcoxi, alqueno, alquino, etc. denotan grupos tanto rectos como ramificados; pero la referencia a un grupo individual tal como "propilo" abarca tan sólo al grupo de cadena recta, aludiéndose específicamente a un isómero de cadena ramificada tal como "isopropilo". Arilo denota un grupo fenilo o un grupo carbocíclico bicíclico ortofusionado que tiene aproximadamente de nueve a diez átomos de anillo, donde al menos un anillo es aromático. Heteroarilo abarca a un grupo unido a través de un carbono cíclico de un anillo aromático monocíclico que contiene cinco o seis átomos de anillo que constan de carbono y uno a cuatro heteroátomos seleccionados cada uno de entre los miembros del grupo que consta de oxígeno no peroxídico, azufre y N(X) donde X está ausente o es H, O, (C₁-C₄) alquilo, fenilo o bencilo, así como un grupo de un heterociclo bicíclico ortofusionado de ocho a diez átomos de anillo derivado de los mismos, y particularmente un benzoderivado o uno obtenido fusionando a ello un digrupo propileno, trimetileno o tetrametileno.

Específicamente, el vocablo "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *t*-butilo y pentilo. Los grupos alquilo preferidos aquí contienen de uno a 6 átomos de carbono, tal como es por ejemplo el caso del metilo, del etilo y de grupos similares.

En el sentido en el que se le utiliza en la presente, el vocablo "cicloalquilo" se refiere a un grupo alquilo cíclico de tres a ocho, y preferiblemente de tres, cinco o seis átomos de carbono. En el sentido en el que se le utiliza en la presente, el vocablo "cicloalquilenos" se refiere a un grupo alquilenos cíclico divalente, y típicamente a un anillo de 3, 5, 6 u 8 miembros.

En el sentido en el que se le utiliza en la presente, el vocablo "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo enlazado a través de un enlace éter terminal sencillo, es decir que un grupo "alcoxi" puede ser definido como -OR donde R es alquilo como se ha definido anteriormente. La expresión grupo "alcoxi inferior" se refiere a un grupo alcoxi que contiene de 1 a 6 átomos de carbono.

En el sentido en el que se le utiliza en la presente, el vocablo "arilo" se refiere a un anillo carbocíclico aromático típicamente de 6 o 10 miembros, donde al menos un anillo es aromático.

Los expertos en la materia comprenderán que pueden existir y ser aislados en formas racémicas y ópticamente activas compuestos destinados a ser usados en la invención y que tengan un centro quiral. Algunos compuestos pueden presentar polimorfismo. Debe entenderse que la presente invención engloba el uso de toda forma racémica, ópticamente activa, polimórfica o estereoisomérica, o mezclas de las mismas, de un compuesto de la invención que posea las propiedades útiles que aquí se describen. Es perfectamente conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas (por ejemplo mediante resolución de la forma racémica mediante técnicas de recristalización, mediante síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, mediante síntesis quiral o mediante separación cromatográfica usando una fase estacionaria quiral) y cómo determinar la actividad anticáncer usando los ensayos estándar que aquí se describen o usando otros ensayos similares que son perfectamente conocidos en la técnica.

Específicamente, alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, 3-pentilo o hexilo; cicloalquilo puede ser ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo; -O(C₁-C₆)alquil(alcoxi) puede ser metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi, pentoxi, 3-pentoxi o hexiloxi.

Se enumeran en la Tabla 1 y en la Tabla 2 compuestos específicos que son útiles para poner en práctica el segundo aspecto de la invención, junto con compuestos afines que no son según la presente invención.

TABLA 1

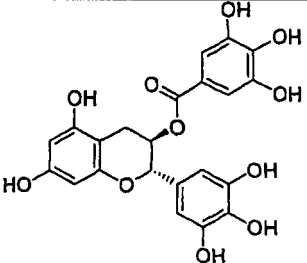
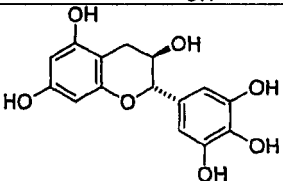
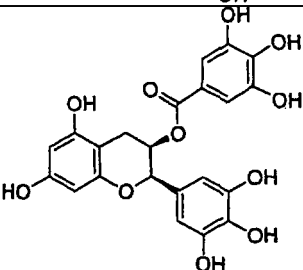
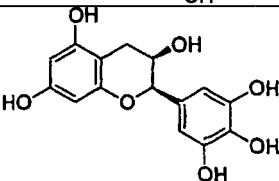
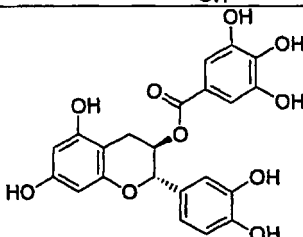
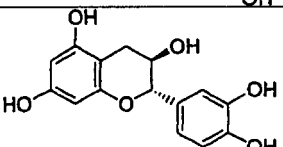
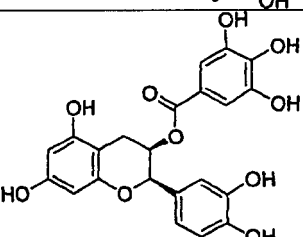
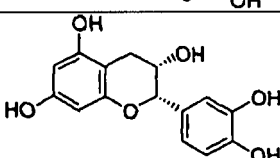
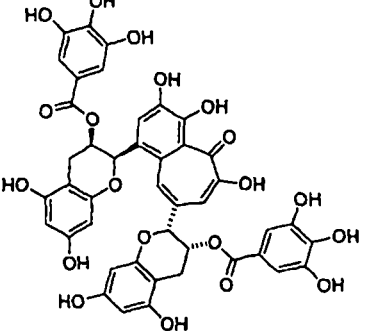
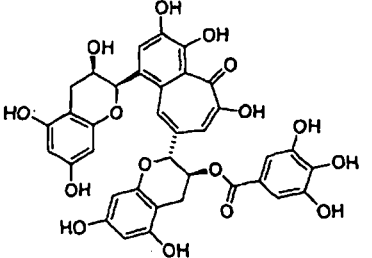
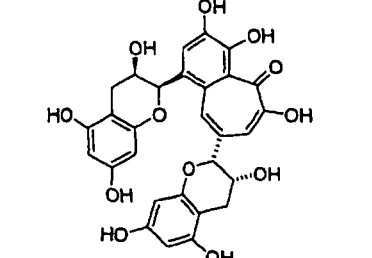
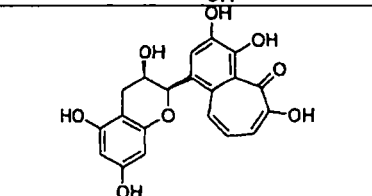
	EXTRACTOS DE TÉ VERDE	
Compuesto	Estructura	IC ₅₀ (μM)
(-) Galocatequina-3-galato (GCG)		0,63
(-) Galocatequina (GC) (no según la invención)		>100
(-) Epigallocatequina-3-galato (EGCG)		0,98
(-) Epigallocatequina (EGC) (no según la invención)		>100
(-) Catequina-3-galato (CG)		0,29
(-) Catequina (C) (no según la invención)		>100
(-) Epicatequina-3-galato (ECG)		0,24
(+) Epicatequina (EC) (no según la invención)		>100

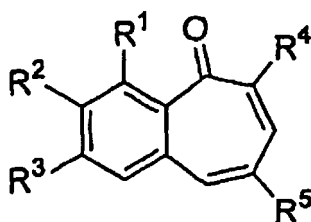
TABLA 2

	EXTRACTOS DE TÉ NEGRO	
Compuesto	Estructura	IC ₅₀ (μM)
Teaflavina Digalato (no según la invención)		>100
Teaflavina-3'-galato		0,60
Teaflavina		1,05
Teaflavanina		0,55

Los ejemplos de polifenoles aislados a partir de té negro o verde y destinados a ser usados en el segundo aspecto de la presente invención incluyen catequinas tales como epicatequina-3 galato (ECG) y epigallocatequina-3 galato; y teaflavinas tales como Teaflavina y teaflavina-3'-galato.

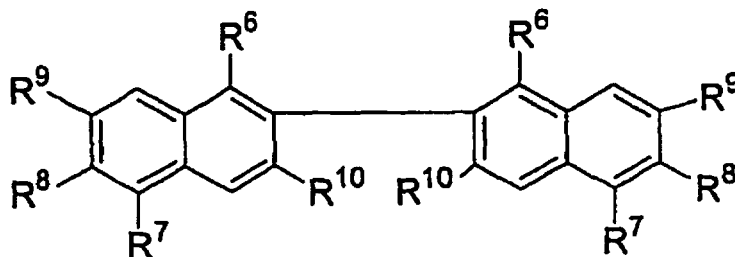
Otros compuestos específicos destinados a ser usados en el segundo aspecto de la presente invención incluyen análogos de Purpurogalina tales como los que se indican en la Tabla 3.

TABLA 3

Derivados de Purpurogalina

CPTO	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
5D1	-H	-OH	-OH	-OH	-COOOC ₂ H ₅
1163	-H	-OH	-OH	-OH	-COOCH ₃
1142	-H	-OH	-OH	-OH	-COOH
6A1	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
6A7	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-H

Los compuestos adicionales que son útiles para la puesta en práctica de los aspectos primero y segundo de la invención incluyen compuestos tales como por ejemplo el apogosipol, que es un compuesto que es menos tóxico para las células normales pero tiene una citotoxicidad similar contra las células de cáncer en comparación con el Gosipol, y análogos de Apogosipol. Estos análogos tienen una mejorada potencia y selectividad para Bcl-x1/2. Los compuestos análogos tienen la fórmula I:



donde: cada R⁶, R⁸, R⁹ y R¹⁰ son independientemente hidrógeno, hidroxilo, -(C₁-C₆)alquilo, -O(C₁-C₆)alquilo, -(C₁-C₆)alquilhalo, -OC(O)(C₁-C₆)alquilo o halo; y cada R⁷ es independientemente hidrógeno, -(C₃-C₈)cicloalquilo, -(C₆-C₁₀)arilo o -(C₁-C₆)alquil(C₆-C₁₀)arilo; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Específicos grupos R⁶, R⁸, R⁹ son independientemente hidrógeno, -OH, -OCH₃, -CF₃, -CH₃, OC₂H₅, -OC(O)CH₃, F, Cl o Br.

Específicos grupos R⁷ son independientemente hidrógeno -C₂H₅; -i-Pr, n-Pr, n-Bu, t-Bu, i-Bu, s-Bu, ciclohexilo.

Específicos grupos R¹⁰ son independientemente hidrógeno, -OH, -OCH₃, -CF₃, -CH₃, OC₂H₅, -OC(O)CH₃, F, Cl o Br.

Un compuesto específico destinado a ser usado en la invención tiene la fórmula (I) donde R⁶, R⁸ y R⁹ son cada uno acetato (-OC(O)CH₃); R⁷ es i-Pr; y R¹⁰ es -CH₃ (Apogosipol hexacetato). Este compuesto puede también ser usado como prodroga para la administración oral de apogosipol. En otra realización los compuestos que están destinados a ser usados en la invención incluyen compuestos de fórmula (I) donde uno de los grupos R⁶ es un grupo distinto de hidrógeno.

En el contexto de la invención, el vocablo "sujeto" se refiere en general a un individuo que va a recibir o ha recibido tratamiento (como p. ej. la administración de los compuestos que están destinados a ser usados en la invención y opcionalmente uno o varios agentes anticáncer para una enfermedad caracterizada por la sobreexpresión de proteínas de la familia Bcl-2 (como p. ej. Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1 o Bcl-B).

En el sentido en el que se las utiliza en la presente, las expresiones “agente anticáncer” o “agente anticáncer quimioterapéutico” se refieren a cualesquiera compuestos quimioterapéuticos, radioterapias y técnicas quirúrgicas que se usen en el tratamiento del cáncer.

5 Los agentes anticáncer que son útiles para poner en práctica la presente invención incluyen agentes catatónicos o agentes quimioterapéuticos para el cáncer. Los ejemplos de agentes catatónicos que son útiles en la puesta en práctica de la invención incluyen pequeñas moléculas, polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, moléculas de ácido nucleico, células y virus. Como ejemplos, los agentes citotóxicos que son útiles en la invención incluyen pequeñas moléculas citotóxicas, o sea compuestos que típicamente apuntan a un proceso asociado al DNA, tales como, 10 por ejemplo, doxorubicina, docetaxel, trastuzumab, ciclofosfamida, melfalan, mitomicina C, bezelesina, cisplatino, doxorubicina, etoposida, mitoxantrona, SN 38, Et 743, actinomicina D, bleomicina y TLk286; péptidos antimicrobianos tales como los que se describen más adelante; polipéptidos proapoptóticos tales como caspasas y toxinas, como por ejemplo caspasa 8; cadena A de la toxina de la difteria, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina del cólera, toxinas de fusión de ligandos tales como DAB389EGF, toxina de *ricinus communis* (ricino); y células citotóxicas tales 15 como células T citotóxicas. Véanse, por ejemplo, Martin y otros, *Cancer Res.*, 60:3218 (2000); Kreitman y otros, *Blood*, 90:252 (1997); Allam y otros, *Cancer Res.*, 57:2615 (1997); y Osborne y otros, *Cancer J. Sci. Am.*, 2:175 (1996).

Los adicionales agentes quimioterapéuticos anticáncer que son adecuados para ser usados en la presente invención incluyen taxanos tales como docetaxel (Taxotere, Aventis Pharmaceuticals, Inc.; Parsippany, NJ) y paclitaxel (Taxol, Bristol Myers Squibb; Princeton, NJ); una antraciclina tal como doxorubicina, idarubicina y daunorubicina; un agente alquilante; un alcaloide vinca; un antimetabolito; un agente de platino tal como cisplatino o carboplatino; un esteroide tal como metotrexato; un antibiótico tal como adriamicina; una isofamida o un modulador selectivo de los receptores de estrógeno; y un anticuerpo tal como trastuzumab. 20

La doxorubicina es un agente quimioterapéutico para el cáncer que es usado comúnmente y puede ser útil, por ejemplo, para tratar el cáncer de mama ((Stewart y otros, en: “Cancer: Principles and Practice of Oncology” 5ª ed., Cap. 19 (eds. DeVita, Jr., y otros; L.P. Lippincott 1997); Harris y otros, “Cancer: Principles and Practice of Oncology”, *supra*, 1997). Adicionalmente, la doxorubicina tiene una actividad angiogénica (Folkman, *Nature Biotechnology*, 15:510 (1997); Steiner, “Angiogenesis: Key principles Science, technology and medicine”, pp. 449 454 (eds. Steiner y otros; Birkhauser Verlag, 1992)), lo cual puede contribuir a su eficacia para tratar el cáncer. 30

Agentes alquilantes tales como melfalan o clorambucil son agentes quimioterapéuticos para el cáncer que son útiles en la presente invención. Análogamente, son agentes quimioterapéuticos para el cáncer que son útiles en la presente invención un alcaloide vinca tal como vindesina, vinblastina o vinorelbina; o un antimetabolito tal como 5-fluorouracilo y 5-fluorouridina. 35

Los agentes de platino son agentes quimioterapéuticos que son útiles en la presente invención. Un agente de platino de este tipo puede ser, por ejemplo, cisplatino o carboplatino como se describe, por ejemplo, en Crown, *Seminars in Oncol.*, 28:28 (2001). Otros agentes quimioterapéuticos para el cáncer que son útiles en la presente invención incluyen el metotrexato, la mitomicina C, la adriamicina, la ifosfamida y las ansamicinas. 40

Agentes quimioterapéuticos para el cáncer que se usan para el tratamiento del cáncer de mama y de otros cánceres hormonalmente dependientes también pueden ser usados como agente que antagoniza el efecto del estrógeno, tal como un modulador selectivo de los receptores de estrógeno o un antiestrógeno. El modulador selectivo de los receptores de estrógeno tamoxifen es un agente quimioterapéutico para el cáncer que puede ser usado en la presente invención para el tratamiento del cáncer de mama (Fisher y otros, *J. Natl. Cancer Instit.*, 90:1371 (1998)). 45

Otro tipo de agente terapéutico que es útil en la presente invención es un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal humanizado. Los ejemplos no limitativos incluyen el anticuerpo receptor 2 del factor de crecimiento antiepidérmico (HER2). El Trastuzumab (Herceptin; Genentech, South San Francisco, CA) es otro agente terapéutico que es útil en la presente invención para tratar los cánceres de mama que sobreexpresan HER2/neu (White y otros, *Annu. Rev. Med.*, 52:125 (2001)). 50

Otro agente terapéutico útil en la invención también puede ser agentes citotóxicos, los cuales según lo que se entiende en la presente son cualquier molécula que promueva directa o indirectamente la muerte celular. 55

Los agentes anticáncer específicos incluyen el Flavopiridol, la Adriamicina (doxorubicina), la VP16 (Etoposida), el Taxol (paclitaxel) y el cisplatino. 60

En los casos en los que los compuestos son lo suficientemente básicos o ácidos como para formar sales ácidas o básicas atóxicas estables, puede ser apropiada la administración de los compuestos en forma de sales. Son ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, como por ejemplo tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, y α -glicerofosfato. Pueden también formarse adecuadas sales inorgánicas entre las que se incluyen las sales hidrocloreto, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato. 65

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser obtenidas usando procedimientos estándar que son perfectamente conocidos en la técnica, como por ejemplo haciendo que un compuesto suficientemente básico tal como una amina reaccione con un ácido adecuado dando lugar a un anión fisiológicamente aceptable. Pueden también hacerse sales de metales alcalinos (como por ejemplo sodio, potasio o litio) o de metales alcalinotérreos (como por ejemplo calcio) de ácidos carboxílicos.

Los compuestos que son útiles en la puesta en práctica de la invención pueden ser puestos en forma de composiciones farmacéuticas y pueden ser administrados a un huésped mamífero tal como un paciente humano en una variedad de formas adaptadas a la ruta de administración elegida, es decir a las rutas oral o parenteral, intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

Así, los compuestos pueden ser administrados sistémicamente, p. ej. oralmente, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un soporte comestible asimilable. Los mismos pueden ser encapsulados en cápsulas de gelatina de vaina dura o blanda, pueden ser comprimidos en forma de tabletas, o pueden ser incorporados directamente a la comida de la dieta del paciente. Para administración terapéutica oral, el compuesto activo puede ser combinado con uno o varios excipientes y puede ser usado en forma de tabletas ingestibles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes y obleas. Tales composiciones y preparaciones deberán contener al menos un 0,1% de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones pueden naturalmente ser variado y puede ser convenientemente de entre aproximadamente un 2 y aproximadamente un 60% del peso de una determinada forma de dosificación unitaria. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.

Las tabletas, los trociscos, las píldoras, las cápsulas y las formas similares pueden también contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y sustancias similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sucrosa, fructosa, lactosa o aspartosa; o bien puede añadirse un agente saborizante tal como menta, aceite de gaulteria o saborizante de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, la misma puede contener, además de los materiales del tipo anteriormente mencionado, un vehículo líquido tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Otros varios materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para de otro modo modificar la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo las tabletas, las píldoras o las cápsulas pueden ser recubiertas con gelatina, cera, goma laca o azúcar. Un jarabe o un elixir puede contener el compuesto activo, sucrosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como preservativos, un colorante y un saborizante tal como sabor de cereza o naranja. Naturalmente, todo material que se use para preparar cualquier forma de dosificación unitaria deberá ser farmacéuticamente aceptable y prácticamente atóxico en las cantidades que se empleen. Adicionalmente, el compuesto activo puede ser incorporado a preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El compuesto activo puede también ser administrado por vía intravenosa o intraperitoneal mediante infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o de sus sales pueden ser preparadas en agua, opcionalmente mezclada con un agente superficiactivo atóxico. Las dispersiones pueden también ser preparadas en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de los microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéutica que son adecuadas para inyección o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprendan el ingrediente activo y estén adaptados para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infusibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación final deberá ser estéril, fluida y estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. El vehículo o soporte líquido puede ser un disolvente o un medio de dispersión líquido que comprenda, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (como por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicoles líquidos), aceites vegetales, ésteres glicerílicos atóxicos, y adecuadas mezclas de los mismos. La fluidez adecuada puede ser mantenida, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del requerido tamaño de partículas en el caso de las dispersiones o mediante el uso de agentes superficiactivos. La evitación de la acción de los microorganismos puede ser realizada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, como por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y timerosal. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos como por ejemplo azúcares, tampones o cloruro sódico. La prolongada absorción de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, como por ejemplo el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el adecuado disolvente con varios de los otros ingredientes que han sido enumerados anteriormente, según se requiera, efectuando a continuación esterilización por filtración. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y de secado por congelación, que producen un polvo del ingrediente activo más todo ingrediente adicional deseado que esté presente en las soluciones previamente filtradas para la esterilización.

Para administración tópica, los compuestos que están destinados a ser usados en la presente invención pueden ser aplicados en forma pura, es decir cuando son líquidos. Sin embargo, en general será deseable administrarlos a la piel

en forma de composiciones o formulaciones, en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido.

Los vehículos sólidos que son útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice y alúmina. Los vehículos líquidos que son útiles incluyen el agua, alcoholes o glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en los cuales los presentes compuestos pueden ser disueltos o dispersados a niveles eficaces, opcionalmente con ayuda de agentes surfactantes atóxicos. Para optimizar las propiedades para un uso determinado pueden añadirse adyuvantes tales como fragancias y adicionales agentes antimicrobianos. Las composiciones líquidas resultantes pueden ser aplicadas desde tampones absorbentes, pueden ser usadas para impregnar vendajes y otros apósitos, o pueden ser aplicadas por pulverización a la zona afectada usando pulverizadores de aerosol o del tipo de los de bomba.

Espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados pueden también ser empleados con vehículos líquidos para formar pastas, geles, ungüentos y jabones extensibles para aplicación directamente a la piel del usuario.

Ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que pueden ser usadas para suministrar los compuestos de fórmula I a la piel son conocidos en la técnica; véanse, por ejemplo, Jacquet y otros (Pat. U.S. N° 4.608.392), Geria (Pat. U.S. N° 4.992.478), Smith y otros (Pat. U.S. N° 4.559.157) y Wortzman (Pat. U.S. N° 4.820.508).

Las dosificaciones útiles de los compuestos de fórmula I pueden ser determinadas comparando su actividad *in vitro* y su actividad *in vivo* en modelos animales. Los métodos para la extrapolación de las dosificaciones eficaces en ratones y otros animales a los humanos son conocidas en la técnica; véase, por ejemplo, la Pat. U.S. N° 4.938.949.

Generalmente, la concentración del (de los) compuesto(s) de fórmula I en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente un 0,1-25% en peso, y preferiblemente de poco más o menos de un 0,5-10% en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente un 0,1-5% en peso, y preferiblemente de poco más o menos un 0,5-2,5% en peso.

La cantidad del compuesto o de una sal o un derivado activa(o) del mismo que se requiera usar en el tratamiento variará no tan sólo con la sal específica seleccionada, sino también con la ruta de administración, la naturaleza del estado que se trate y la edad y el estado del paciente, y quedará en última instancia a discreción del médico o clínico que trate al paciente.

En general, sin embargo, una dosis adecuada será de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg, p. ej. de aproximadamente 10 a aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal por día, tal como de 3 a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal del receptor por día, preferiblemente de 6 a 90 mg/kg/día, y con la máxima preferencia de 15 a 60 mg/kg/día.

Los compuestos que son útiles en la invención pueden ser marcados usando métodos conocidos en la técnica. Un grupo detectable preferido es un grupo fluorescente. Los grupos fluorescentes típicamente producen una alta relación señal/ruido, proporcionando con ello una incrementada resolución y sensibilidad en un procedimiento de detección. Preferiblemente, el grupo fluorescente absorbe luz con una longitud de onda de más de aproximadamente 300 nm, más preferiblemente de más de aproximadamente 350 nm, y con la máxima preferencia de más de aproximadamente 400 nm. La longitud de onda de la luz emitida por el grupo fluorescente es preferiblemente de más de aproximadamente 310 nm, más preferiblemente de más de aproximadamente 360 nm, y con la máxima preferencia de más de aproximadamente 410 nm.

La mitad detectable fluorescente es seleccionada de entre las de una variedad de clases estructurales que incluyen los ejemplos siguientes: 1- y 2-aminonaftaleno, p,p'-diaminoestilbenos, pirenos, sales de fenantridina cuaternarias, 9-aminoacridinas, p,p'-diaminobenzofenona iminas, antracenos, oxcarbocianina, marocianina, 3-aminoequilenina, perileno, bisbenzoxazol, bis-p-oxazolil benceno, 1,2-benzofenazina, retinol, sales de bis-3-aminopridinio, helebrigenina, tetraciclina, esterofenol, bencimidazolil fenilamina, 2-oxo-3-cromeno, indol, xanteno, 7-hidroxycumarina, fenoxazina, salicilato, estrofentidina, porfirinas, triarilmetanos, flavina, colorantes de xanteno (como p. ej. colorantes de fluoresceína y rodamina); colorantes de cianina; colorantes de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno y proteínas fluorescentes (como p. ej. proteína fluorescente verde, ficobiliproteína).

Los componentes pueden ser marcados, donde el grupo marcador emite espontáneamente una señal o genera una señal al ser introducido un estímulo adecuado. Las marcas incluyen átomos tales como, por ejemplo, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F y ¹H.

El compuesto es convenientemente administrado en forma de dosificación unitaria, conteniendo por ejemplo de 5 a 1000 mg, convenientemente de 10 a 750 mg, y con la máxima conveniencia de 50 a 500 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.

Idealmente, el ingrediente activo deberá ser administrado para alcanzar unas concentraciones máximas en plasma del compuesto activo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 75 μ M, preferiblemente de poco más o menos 1 a 50 μ M, y con la máxima preferencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 μ M. Esto puede lograrse por

ejemplo mediante la inyección intravenosa de una solución al 0,05-5% del ingrediente activo, opcionalmente en salina, o bien mediante administración oral en forma de bolo que contenga aproximadamente 1-100 mg del ingrediente activo. Los deseables niveles en sangre pueden ser mantenidos mediante infusión continua para aportar aproximadamente 0,01-5,0 mg/kg/h o mediante infusiones intermitentes que contengan aproximadamente 0,4-15 mg/kg del (de los) ingrediente(s) activo(s).

La dosis deseada puede ser convenientemente presentada en una dosis única o en forma de dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo en forma de dos, tres, cuatro o más subdosis por día. La propia subdosis puede ser adicionalmente dividida p. ej. en una serie de administraciones discretas flexiblemente espaciadas, tales como una pluralidad de inhalaciones desde un insuflador.

Los estudios de acoplamiento con soporte lógico informático FlexX (Kramer y otros, *Proteins*, 37:228 (1999)) implementado en Sybyl (TRIPOS) usando la conformación Bcl-x_L que se encuentra en el complejo con péptido Bak pusieron de manifiesto una óptima ubicación para Gosipol en la profunda hendidura hidrofóbica que es normalmente ocupada por el péptido Bak helicoidal BH3 en el complejo (Fig. 3a). Acoplamos los estereoisómeros tanto (+) como (-) de Gosipol, por cuanto que éstos presentaron distinta actividad en anteriores ensayos celulares que demostraron que el (-) Gosipol es diez veces más eficaz que el (+) Gosipol como agente citotóxico (Qiu y otros, *Exp. Biol. Med.*, 227:398 (2002)). La bondad del acoplamiento según medición efectuada mediante una función de puntuación (Pervushin y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:12366 (1997)), y la energía intermolecular tras minimización con la rutina DOCK de Sybyl, fue considerablemente mejor para el (-) Gosipol (-32,7 Kcal/mol) frente al (+) Gosipol (-25 Kcal/mol), de acuerdo con estas observaciones. Se muestra (Fig. 3a) la estructura del (-) Gosipol, pero el posicionamiento global de ambos estereoisómeros de Gosipol es muy similar.

Para evaluar la actividad citotóxica de compuestos en células tumorales humanas, sometimos a ensayo sus actividades biológicas usando ensayos de reducción de colorante XTT usando dos líneas celulares de cáncer de mama: MCF7 (alto expresor de Bcl-2/Bcl-x_L) y ZR75-1 (bajo expresor de Bcl-2/Bcl-x_L). El Gosipol es un agente citotóxico para las células MCF7 y ZR75-1 (Fig. 4 a, b), reduciendo la viabilidad celular de manera dependiente de la dosis, con unos valores IC₅₀ de 13,2 μ M y 8,4 μ M, respectivamente. La purpurogalina, sin embargo, no presentó una apreciable actividad en estos ensayos, debido potencialmente a su carácter hidrofílico (ClogP $\sim$ 0,7). En consonancia con esta observación, un derivado 5D1 de Purpurogalina que previsiblemente tiene mejores propiedades de permeabilidad de membrana celular (sobre la base de su ClogP $\sim$ 2,5) redujo la viabilidad celular de una manera dependiente de la dosis, con un valor IC₅₀ de $\sim$ 50 μ M para la línea celular ZR75-1 (no ilustrado). Por estas razones, evaluamos adicionalmente la actividad celular de los compuestos en células HeLa (Tabla 3), de las que se sabe que son menos selectivas para la absorción de compuestos. Los datos de inhibición obtenidos con los ensayos de viabilidad de las células HeLa guardan paralelismo con los datos de fijación *in vitro* con Bcl-x_L (Tabla 3), con un coeficiente de correlación de $r = 0,9$ ($p = 0,001$).

Parte experimental

Ensayos de polarización de fluorescencia (FPA). Los ensayos FPA fueron llevados a cabo con un péptido Bad marcado con fluoresceína (NLWAAQRYGRELRRMSD-K(FITC)FVD) (Synpep Corporation, Dublin, CA) usando un LJI Analyst HT (Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA). El tampón de dilución para todos los materiales y muestras era Tris-Bis 50 mM pH 7,4 con gammaglobulina bovina al 0,01%. Se preparó en tampón de dilución una serie de diluciones al doble de Gosipol, es decir a 100 μ M, 50 μ M y hasta 0,1 μ M. Fue introducida en cada tubo una solución que contenía 30 nM de Bcl-x_L y péptido fluoresceinado 4 nM. Los tubos fueron incubados por espacio de 5 minutos a temperatura ambiente y 20 μ l de cada mezcla de reacción fueron transferidos a una placa de microcultivo HE Microplate de poliestireno negro de 96 pocillos (LJI Biosystems Co.). Todos los ensayos se efectuaron por cuadruplicado, no recibiendo Gosipol los pocillos testigo. Entonces se efectuó la lectura de la intensidad total en la placa y se midió la polarización (en mP). Los controles incluían mediciones de las respuestas a la dosis en ausencia de las proteínas, para valorar cualesquiera interacciones entre los compuestos y el péptido FITC-BH3. Los efectos contingentes fueron tomados en consideración mediante sustracción.

Espectroscopia de RMN. Los espectros 2D[¹⁵N,¹H]-TROSY (Pervushin y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:12366 (1997); Pellecchia y otros, *Nat. Rev. Drug Disc.*, 1:211 (2002) para Bcl-x_L fueron medidos con muestras 0,5 mM de Bcl-x_L marcadas con ¹⁵N. Las Bcl-x_L no marcadas y marcadas con ¹⁵N fueron preparadas y purificadas como se describe en Sattler y otros, *Science*, 275:983 (1997). Para los estudios de mapeo de desplazamiento químico y de acoplamiento usamos la estructura tridimensional de Bcl-x_L en complejo con péptido Bak (código PDB 1BXL). Además del mapeo de desplazamiento químico con proteínas marcadas, se llevaron también a cabo mediciones de T_{1ρ} (Hajduk y otros, *J. Am. Chem. Soc.*, 119:12257 (1997)) y experimentos de transferencia de saturación tales como los experimentos WaterLOGSY (Dalvit y otros, *J. Biomol. NMR*, 18:65 (2000)) para validar adicionalmente la fijación de los compuestos estudiados a Bcl-x_L. Todos los experimentos fueron llevados a cabo con un espectrómetro Varian Unity+ de 500 MHz o un espectrómetro Bruker Avance600 de 600 MHz, ambos equipados con cuatro canales *rf* y gradientes de campo pulsátil en el eje z. La saturación de agua selectiva fue llevada a cabo con un tren de impulsos IBURP2 selectivos de 7 mseg. de duración y espaciados por un retardo de 10 mseg. El tiempo de saturación total usado era de 2,5 seg. Las series T_{1ρ} fueron medidas con un impulso de bloqueo de espines de longitud variable. Las mediciones fueron entonces llevadas a cabo con un tiempo de bloqueo de espines de 1 mseg., 10 mseg., 50 mseg., 150 mseg., 200 mseg., 250 mseg. y 300 mseg. con compuestos 100 μ M en ausencia y en presencia de pro-

teína 10 μM . En todos los experimentos, el defasaje de las señales de agua residual fue obtenido con una secuencia WATERGATE.

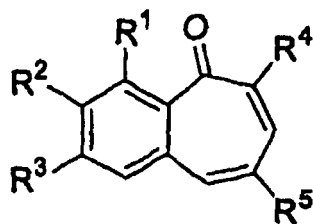
Modelación Molecular. Los estudios de modelación molecular fueron llevados a cabo en varias estaciones de trabajo R12000 SEGI Octane con el paquete de software Sybyl versión 6.9 (TRIPOS). La estructura acoplada de Gosipol fue inicialmente obtenida mediante el programa FlexX (Kramer y otros, *Proteins*, 37:228 (1999)) como se le implementa en Sybyl. Se efectuaron dos cálculos. En el primero se mantuvieron fijos los ángulos de torsión de los sitios de fijación, mientras que en el segundo podían variar libremente los ángulos de torsión de las cadenas laterales. La función de puntuación media para las 30 mejores soluciones era tan sólo ligeramente inferior cuando las cadenas laterales tenían libertad de rotación. La posición de las cadenas laterales en el modelo no varió considerablemente con respecto a los valores iniciales. La función de puntuación para (+) Gosipol era inferior a la del (-) Gosipol, pero el posicionamiento global de ambos estereoisómeros era muy similar. Las resultantes estructuras de la mejor puntuación fueron a continuación minimizadas en energía usando la rutina DOCK de SYBYL manteniendo rígido el sitio. La energía de los ligandos tras la minimización DOCK estaba dentro de una tolerancia de 5 Kcal/mol con respecto a su mínimo global de energía. La superposición de los compuestos fue obtenida mediante la rutina MULTIFIT de SYBYL. Se prepararon con los programas SYBYL y MOLMOL figuras a color que mostraban las estructuras tridimensionales (Koradi y otros, *J. Mol. Graph.*, 14:29; 14:51 (1996)).

El efecto inhibitorio de los compuestos en la supervivencia de las células de cáncer. Los efectos de los compuestos que se estudian en esta memoria en la viabilidad de células tumorales en cultivo fueron verificados usando ensayos XTT (Weislow y otros, *J. Natl. Cancer Inst.*, 81:577 (1989)) con las líneas celulares MCF7 y ZR75-1. Las células MCF7 fueron cultivadas en DMEM que contenía un 10% de suero bovino fetal y penicilina/estreptomicina y estaba suplementado con insulina 10^{-10}M , piruvato sódico 1 mM y glutamina. Las células ZR75-1 fueron cultivadas en RPMI que contenía un 10% de suero bovino fetal y penicilina/estreptomicina y estaba suplementado con tampón HEPES, piruvato sódico 1 mM y glutamina. Se verificó regularmente la contaminación micoplasmática de las células. Las células eran triplicados sembrados a una densidad de células inicial de 1.000 células por pocillo. Los pocillos testigo no recibieron células. Gosipol, Purpurogalina y 5D1 fueron añadidos a concentraciones finales de 0, 1, 10 y 100 μM e incubados por espacio de tres días. Los números relativos de células viables fueron determinados mediante ensayo XTT. Brevemente, en una placa de 96 pocillos añadimos a cada pocillo 50 μl de una mezcla de 1 mg/ml de XTT (Weislow y otros, *J. Natl. Cancer Inst.*, 81:577 (1989)) (hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio) (Polysciences, Washington, PA) que contenía 0,025 PMS (fenacina metosulfato) 0,025 mM. Las placas de 96 pocillos fueron reincubadas por espacio de otras 4 horas para permitir la producción de formazan XTT. Entonces fue mezclado el contenido de cada placa y fueron determinadas las densidades ópticas a una longitud de onda de 450 nm (OD_{450}). La OD_{450} neta fue determinada tras restar la OD_{450} de los pocillos testigo. Células HeLa de pocos pases (de un número de pases de entre 10 y 20) fueron transfectadas con plásmidos pcDNA3-Bcl- x_L o pcDNA3 de control usando el reactivo Lipofectamina Plus (Invitrogen) y seleccionadas en medio que contenía 800 $\mu\text{g/ml}$ de G418. El análisis Inmunoblot de Bcl- x_L fue llevado a cabo como se ha descrito (Krajanski 1996 - Cancer Res). Las HeLa transfectantes fueron tratadas con varias dosis de Gosipol, Purpurogalina y sus derivados (0, 1, 3, 10 y 100 μM).

Sustancias Químicas. Los polifenoles puros fueron obtenidos de la SIGMA (Gosipol y Purpurogalina) y/o de la Microsource Discovery Systems (derivados de Purpurogalina). Los compuestos de referencia fueron obtenidos de la Chembridge Corp. (San Diego). El Gosipol fue sometido a ensayo en forma de mezcla racémica de isómeros (+) y (-). Los compuestos fueron disueltos en DMSO a una concentración 100 mM y almacenados a -20°C . Antes de su adicional dilución para los ensayos de fijación y desplazamiento se efectuaba periódicamente un análisis por NMR de los compuestos como control de calidad. La reactividad del Gosipol se verificaba con una proteína de ensayo marcada con ^{15}N (dominio BIR3 de XIAP). Una solución que contenía Gosipol 1 mM y BIR3 marcado con ^{15}N 200 μM fue incubada por espacio de dos horas y el espectro de correlación de [^{15}N , ^1H] fue registrado y comparado con el espectro del apo-Bir3. No se observaron apreciables diferencias en los espectros.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 4

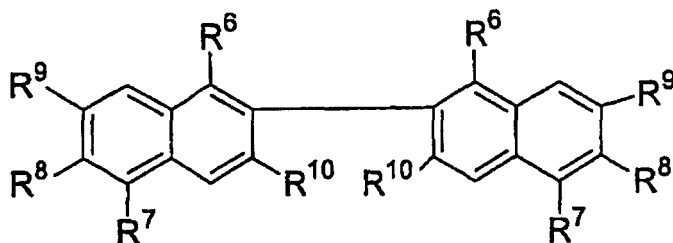


CPTO	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	IC ₅₀ (μM) (Bcl-x _L)	IC ₅₀ (μM) HeLa
Purpurogalina	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	2,2	6,5
5D1	-H	-OH	-OH	-OH	-COOOC ₂ H ₅	73	51,5
1163	-H	-OH	-OH	-OH	-COOCH ₃	2,6	-30
1142	-H	-OH	-OH	-OH	-COOH	7,4	22,9
6A1	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	>100	>100
6A7	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-H	>100	>100

Relaciones de actividad estructural (SAR) de derivados de Purpurogalina

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto que tiene la fórmula (I):



donde: cada R^6 , R^8 , R^9 y R^{10} es independientemente hidrógeno, hidroxilo, $-(C_1-C_6)$ alquilo, $-O(C_1-C_6)$ alquilo, $-(C_1-C_6)$ alquilhalo, $-OC(O)(C_1-C_6)$ alquilo o halo; y cada R^7 es independientemente hidrógeno, $-(C_3-C_8)$ cicloalquilo, $-(C_6-C_{10})$ arilo o $-(C_1-C_6)$ alquil (C_6-C_{10}) arilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un mamífero.

2. El uso de la reivindicación 1, donde cada grupo R^6 , R^8 y R^9 es independientemente hidrógeno, $-OH$, $-OCH_3$, $-CF_3$, $-CH_3$, OC_2H_5 , $-OC(O)CH_3$, F , Cl o Br .

3. El uso de las reivindicaciones 1 ó 2, donde cada grupo R^7 es independientemente hidrógeno $-C_2H_5$; $-i-Pr$, $n-Pr$, $n-Bu$, $t-Bu$, $i-Bu$, $s-Bu$ o ciclohexilo.

4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde cada grupo R^{10} es independientemente hidrógeno, $-OH$, $-OCH_3$, $-CF_3$, $-CH_3$, OC_2H_5 , $-OC(O)CH_3$, F , Cl o Br .

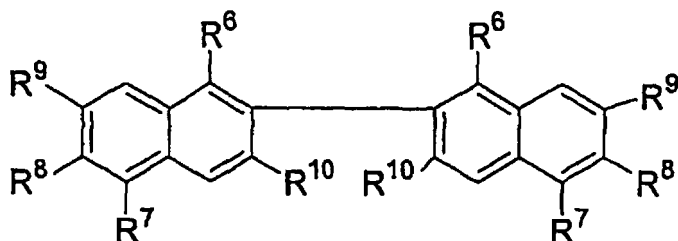
5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde cada R^6 , R^8 y R^9 es $-OC(O)CH_3$; cada R^7 es i -propilo; y cada R^{10} es $-CH_3$.

6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal o leucemia.

7. El uso de la reivindicación 6, donde la leucemia es leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda o leucemia mielógena crónica.

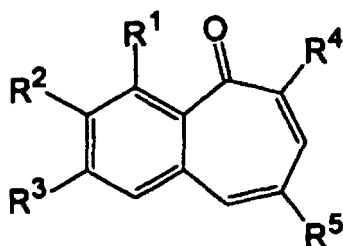
8. El uso de un agente quimiosensibilizador seleccionado del grupo que consta de gosispol, apogosispol, análogos de apogosispol, teaflavina, teaflavina-3'-galato, teaflavanina, $(-)$ galocatequina-3-galato (GCG), $(-)$ epigalocatequina-3-galato (EGCG), $(-)$ catequina-3-galato (CG), $(-)$ epicatequina-3-galato (ECG), análogos de purpurogalina y mezclas de los mismos, para la fabricación de un medicamento, siendo el medicamento para administración en combinación con un agente anticáncer, para tratar el cáncer en un sujeto;

donde el análogo de apogosispol es un compuesto que tiene la fórmula (I):



donde: cada R^6 , R^8 , R^9 y R^{10} son independientemente hidrógeno, hidroxilo, $-(C_1-C_6)$ alquilo, $-O(C_1-C_6)$ alquilo, $-(C_1-C_6)$ alquilhalo, $-OC(O)(C_1-C_6)$ alquilo o halo; y cada R^7 es independientemente hidrógeno, $-(C_3-C_8)$ cicloalquilo, $-(C_6-C_{10})$ arilo o $-(C_1-C_6)$ alquil (C_6-C_{10}) arilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

y donde el análogo de purpurogalina es un compuesto que tiene la fórmula siguiente:



donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son como se define en la tabla siguiente:

	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
5D1	-H	-OH	-OH	-OH	-COOOC ₂ H ₅
1163	-H	-OH	-OH	-OH	-COOCH ₃
1142	-H	-OH	-OH	-OH	-COOH
6A1	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
6A7	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-H

9. El uso de la reivindicación 8, donde cada grupo R^6 , R^8 , R^9 y R^{10} es independientemente hidrógeno, -OH, -OCH₃, -CF₃, -CH₃, OC₂H₅, -OC(O)CH₃, F, Cl o Br.

10. El uso de las reivindicaciones 8 ó 9, donde cada grupo R^7 es independientemente hidrógeno, -C₂H₅; -i-Pr, n-Pr, n-Bu, t-Bu, i-Bu, s-Bu o ciclohexilo.

11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, donde cada R^6 , R^8 y R^9 es -OC(O)CH₃; cada R^7 es i-propilo; y cada R^{10} es -CH₃.

12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde el agente quimiosensibilizador y el agente anticáncer son administrados al mismo tiempo.

13. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde el agente quimiosensibilizador es administrado antes del agente anticáncer.

14. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 8-13, donde el agente anticáncer es Flavopiridol, Adriamicina, Etoposida, Taxol, cisplatino o una combinación de los mismos.

15. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 8 o 12-14, donde el análogo de purpurogalina es 5D1, 1163 ó 1142.

16. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 8-15, donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal o leucemia.

17. El uso de la reivindicación 16, donde la leucemia es leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda o leucemia mielógena crónica.

Fig. 1

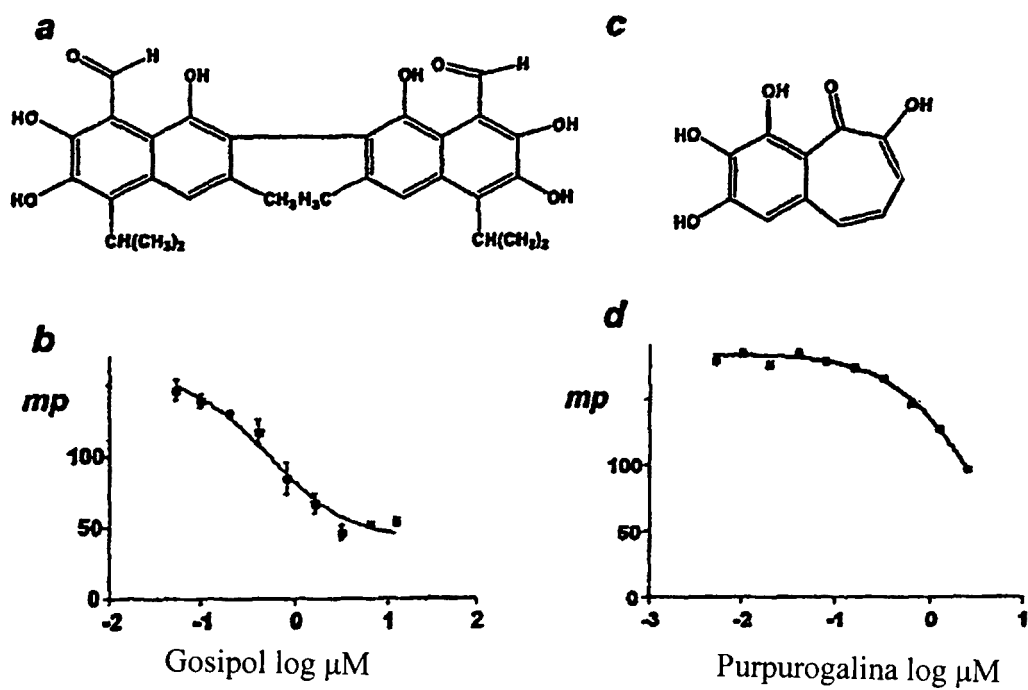


Fig. 2

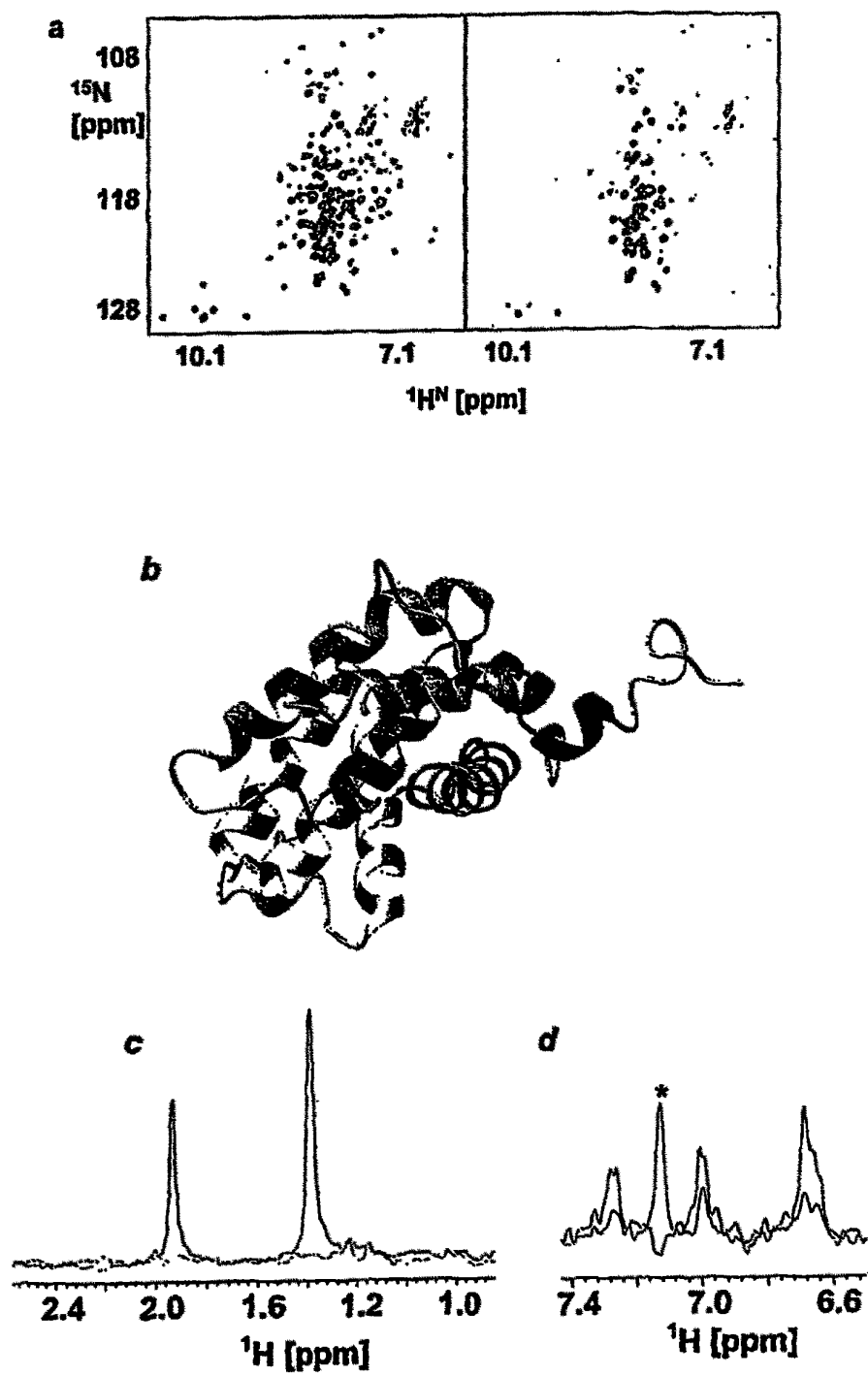


Fig. 3

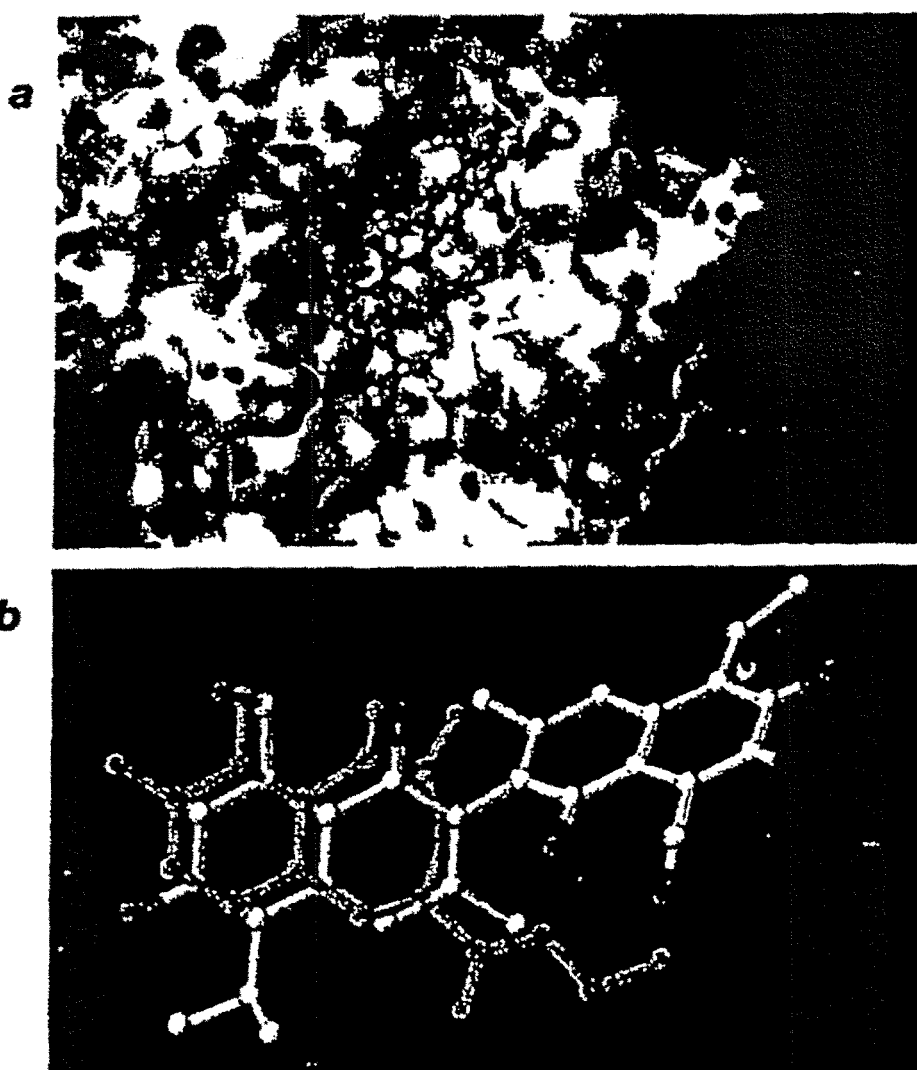


Fig. 4

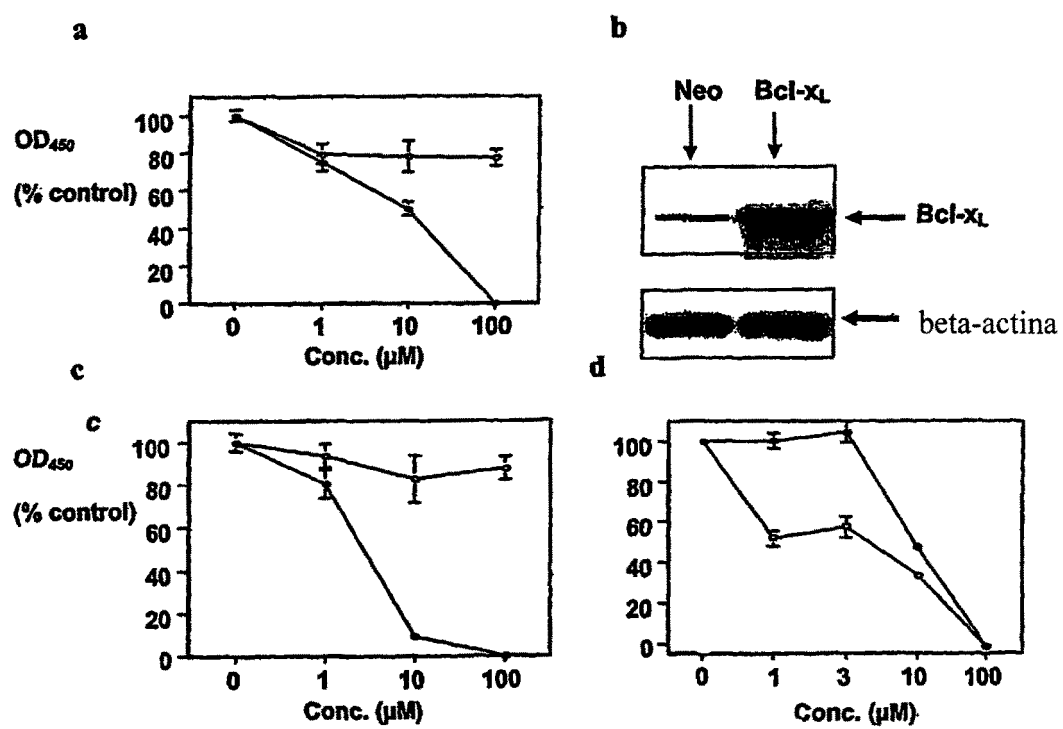


Figura 5: Actividad de 6C1 y Gosipol como agente único en CLL recién diagnóstica no tratada anteriormente

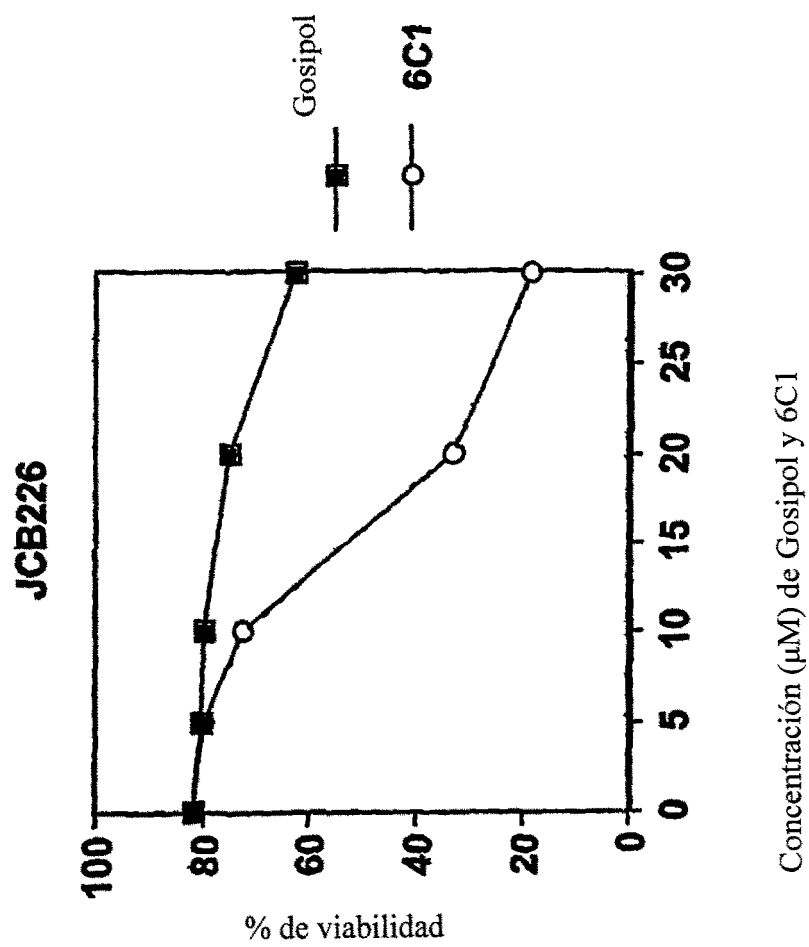


Figura 6: Efecto aditivo de 6C1 y F-ara-A

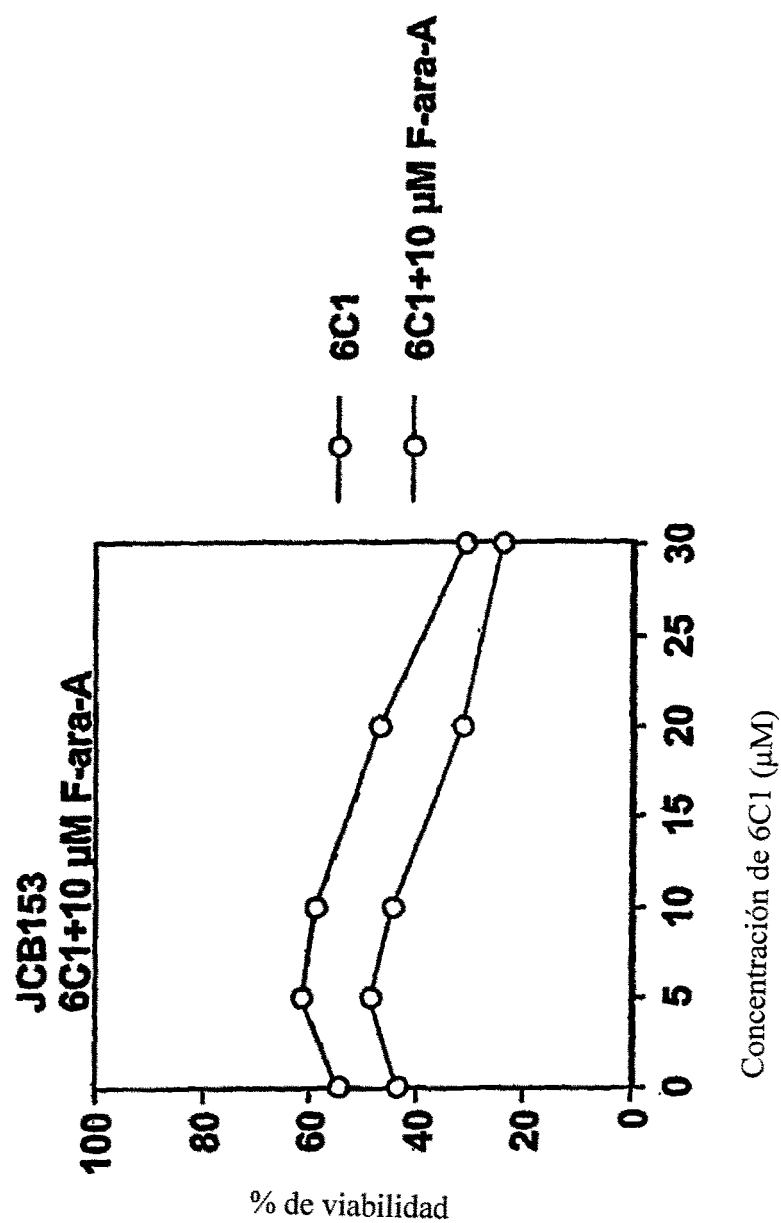


Figura 7: Efecto sinérgico de 6C1 con F-ara-A

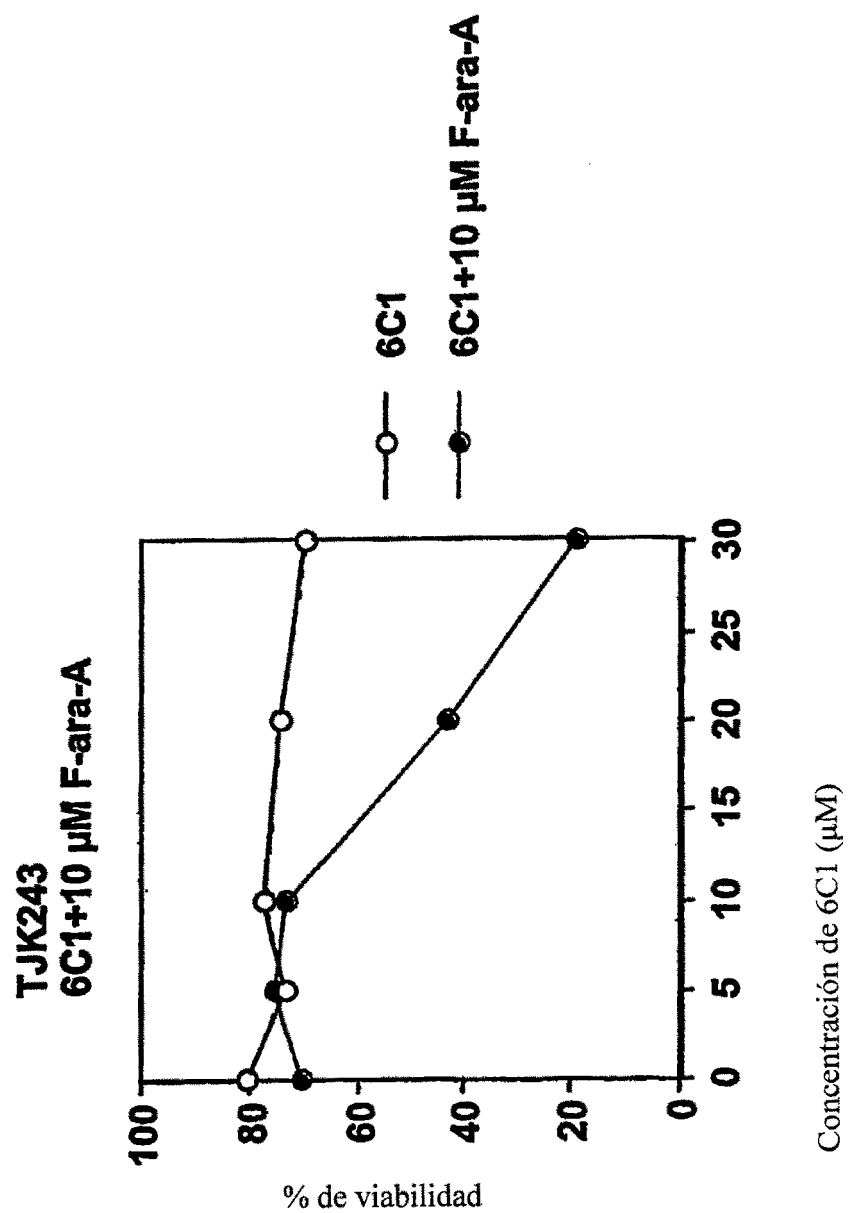


Fig. 8

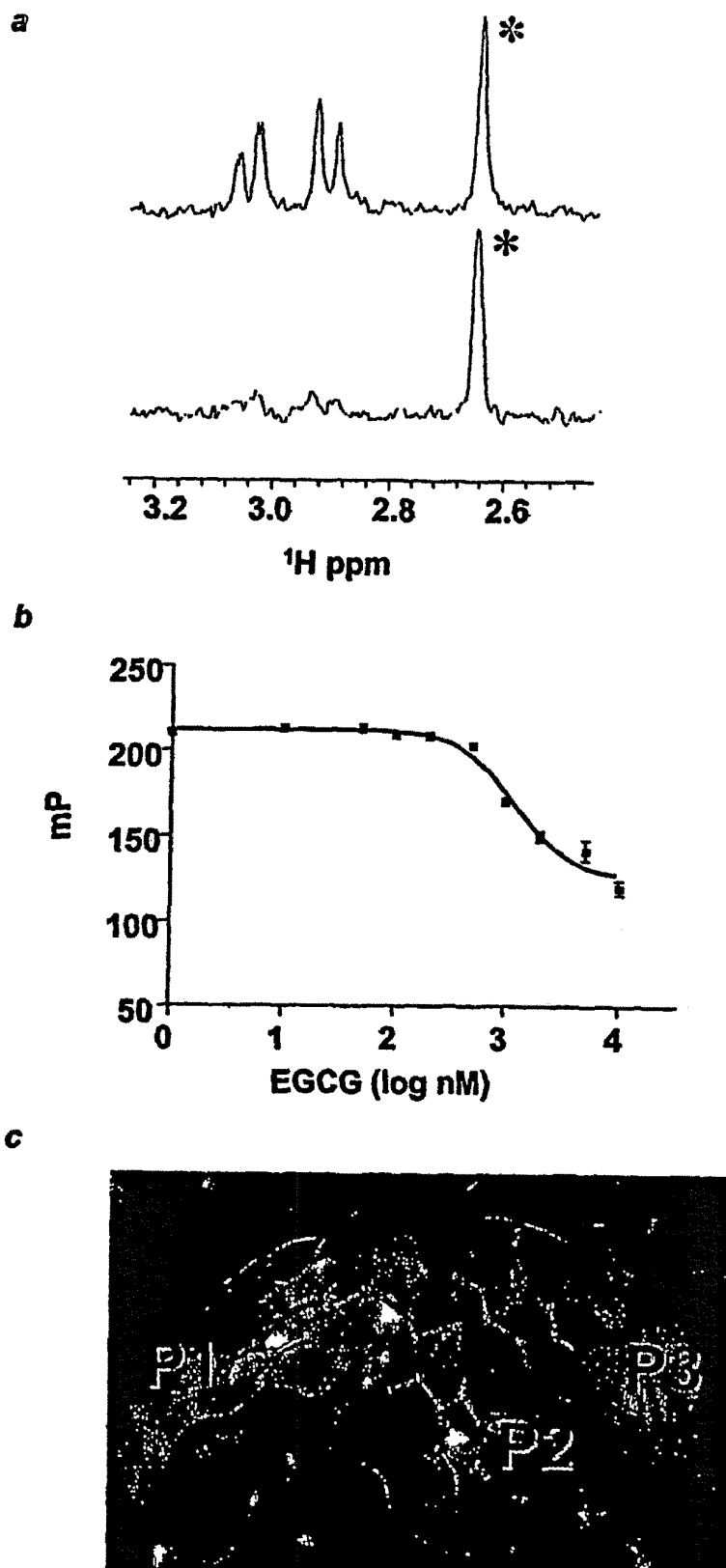
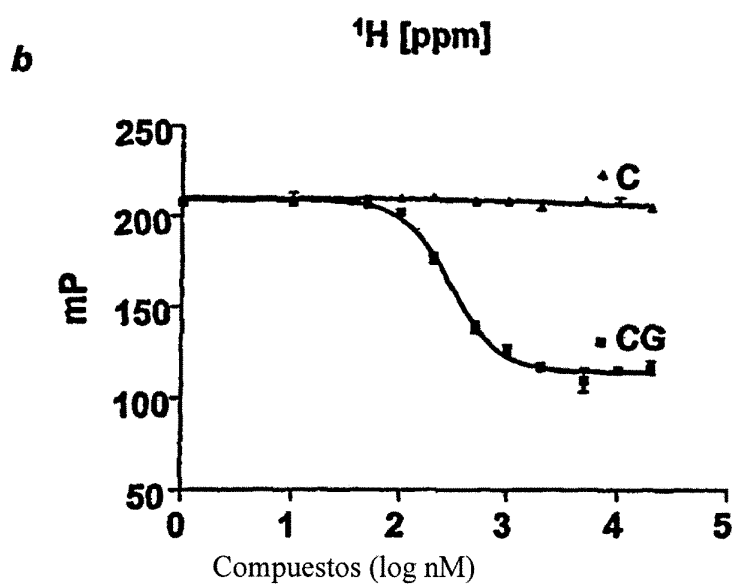
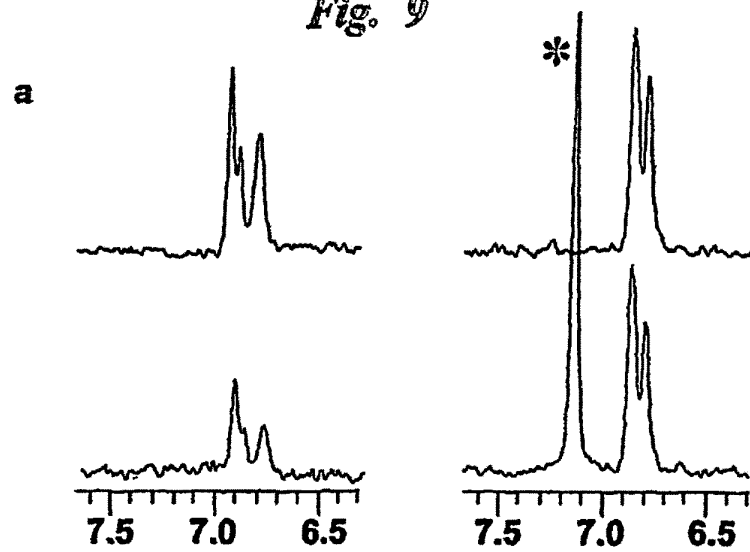


Fig. 9



c



Fig. 10

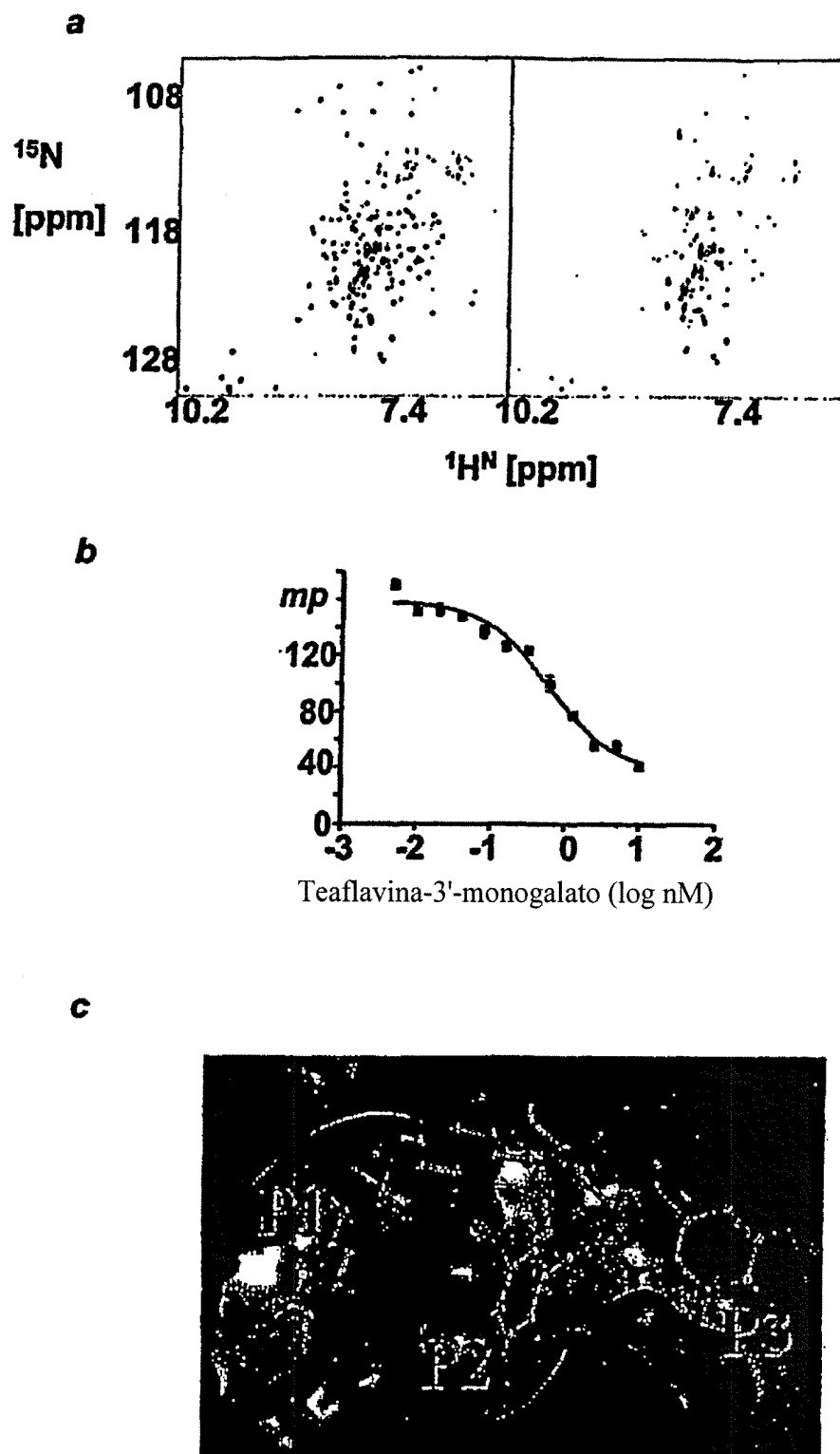


Fig. 11

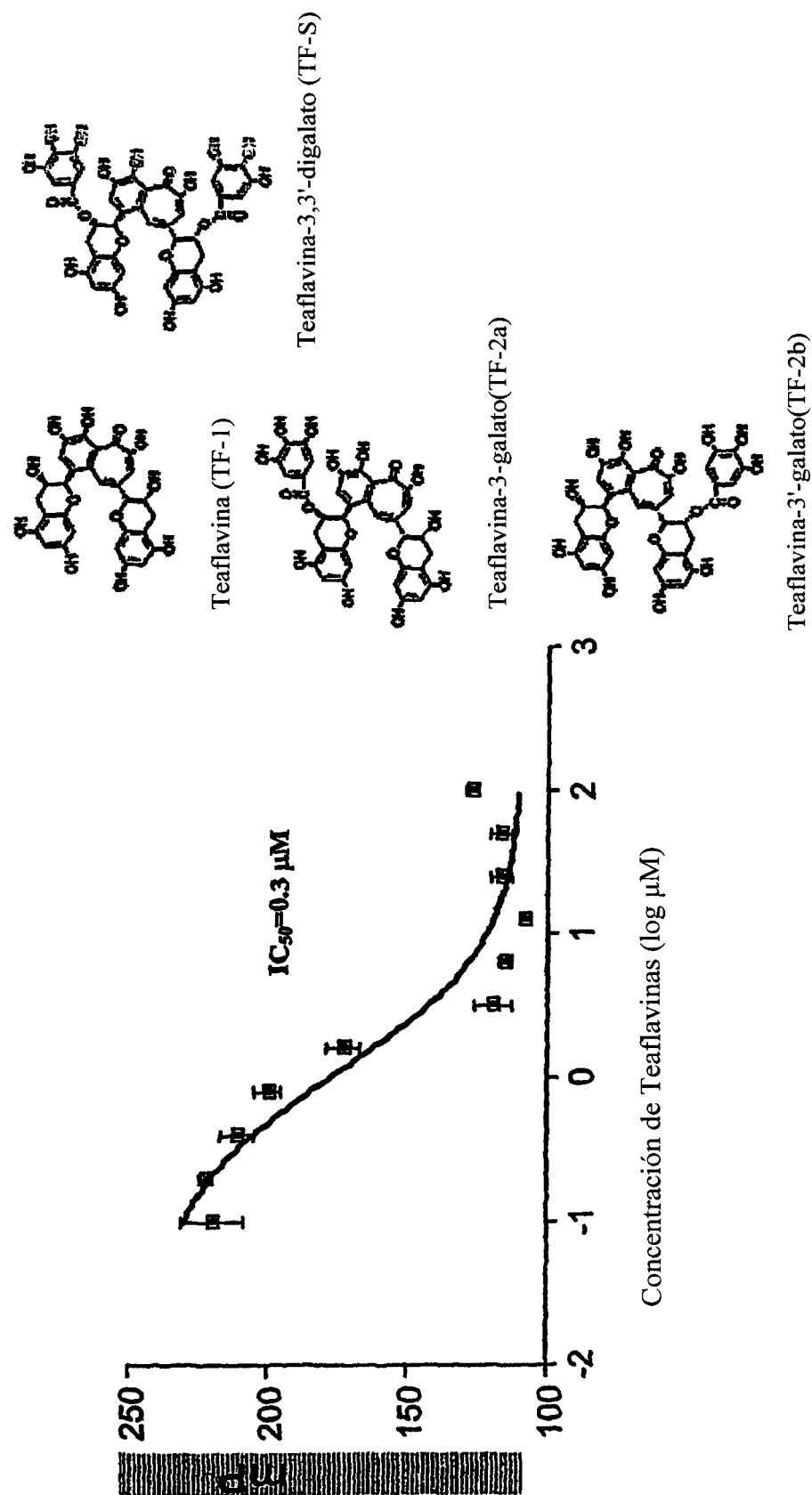


Fig. 12

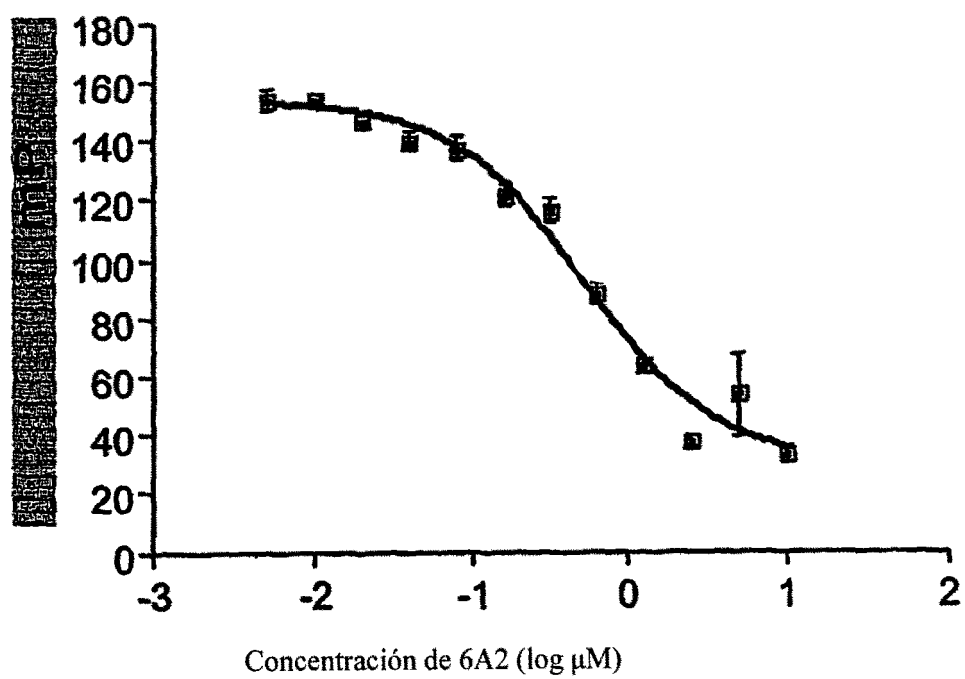


Fig. 13

SIK899 HELA

Efecto de 6A2 en las células Hela

Ensayo XTT

IC50=7.313 Mm

Intervalo de confianza del 95%: de 4,234 a 12,63 μ M

