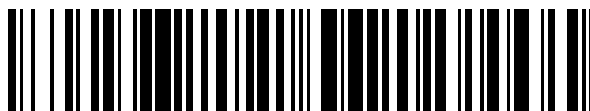


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 932**

51 Int. Cl.:

**C07D 215/38** (2006.01)

**A61K 31/00** (2006.01)

**A61K 31/4709** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013 PCT/US2013/031159**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13148228**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13770319 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2831047**

54 Título: **Inhibidor de PFKFB3 y métodos de uso como terapéutico contra el cáncer**

30 Prioridad:

**29.03.2012 US 201261617073 P**

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

**16.08.2017**

73 Titular/es:

**ADVANCED CANCER THERAPEUTICS, LLC  
(100.0%)  
300 East Market Street, Suite 280  
Louisville, KY 40202, US**

72 Inventor/es:

**CHAND, POORAN y  
TAPOLSKY, GILLES, H.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 629 932 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

Inhibidor de PFKFB3 y métodos de uso como terapéutico contra el cáncer

Campo técnico

- 5 El tema descrito actualmente se refiere a un nuevo agente contra el cáncer, (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona, como un inhibidor de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 3 (PFKFB3) y a este agente y composiciones que comprenden este agente para su uso en el tratamiento de cáncer y tumores en mamíferos, incluyendo seres humanos.

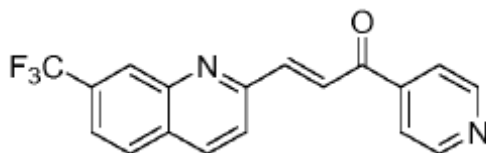
Antecedentes de la técnica

- 10 La ruta glucolítica es una serie de diez etapas de reacciones que forma la ruta metabólica principal en casi todos los organismos. El flujo a través de la ruta glucolítica se ajusta en respuesta a las condiciones tanto dentro como fuera de la célula. Las reacciones glucolíticas irreversibles son aquellas catalizadas por hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa. En las rutas metabólicas, tales enzimas son blancos potenciales para el control, y las tres enzimas sirven a este propósito en la glucólisis. Las enzimas PFKFB (PFKFB 1-4) sintetizan fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP) que activa la 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1), un punto de control esencial en la ruta glucolítica.
- 15 Las células neoplásicas utilizan preferentemente glucólisis para satisfacer sus necesidades incrementadas de energía y precursores biosintéticos. Las células tumorales malignas tienen velocidades glucolíticas que son hasta 200 veces más altas que las de sus tejidos normales de origen. Una estrategia de ataque de cáncer ha sido tratar el cáncer privando de nutrientes las células cancerosas de varias maneras. La reducción o bloqueo del mecanismo de flujo glucolítico mejorado presente en las células cancerosas ha estimulado un interés reciente.
- 20 A pesar de una mayor comprensión y avances farmacéuticos en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, todavía se estima que casi el 13% de todas las muertes humanas del año pasado se debieron al cáncer. De este modo, sigue existiendo la necesidad de terapéuticos contra el cáncer seguros y eficaces, en particular aquellas que se dirigen a células neoplásicas a través de mecanismos tales como el flujo glucolítico, que se sobreexpresan en células cancerosas.

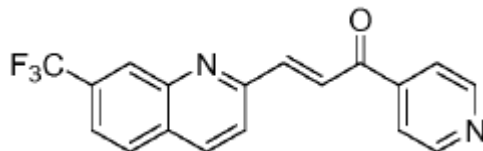
- 25 Resumen de la invención

Se proporciona en este documento un inhibidor de PFKFB3 que ha demostrado propiedades *in vitro* inesperadamente superiores, propiedades farmacocinéticas *in vivo*, tolerancia *in vivo* y datos de seguridad, e inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral en comparación con derivados de quinolil-propenona descritos anteriormente.

- 30 En una realización, se proporciona un compuesto que consiste en (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la fórmula:



En otra realización, se proporciona el compuesto (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la fórmula:



- 35

para uso en el tratamiento del cáncer.

En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer, que comprende:

(a) una cantidad eficaz de (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(b) al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, se proporciona el compuesto (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de un tumor.

5 En incluso otra realización, se proporciona un método *in vitro* para inhibir el flujo glucolítico en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización, se proporciona un método *in vitro* para inhibir la actividad enzimática de PFKFB3 en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Estos y otros objetos, características, realizaciones y ventajas resultarán evidentes para los expertos en el arte a partir de una lectura de las descripciones detalladas. Todos los porcentajes, relaciones y proporciones en este documento son en peso, a menos que se especifique lo contrario. Todas las temperaturas están en grados Celsius (°C) a menos que se especifique lo contrario.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 muestra la inhibición de la actividad enzimática de PFKFB3 frente a la concentración para PFK-158 (ensayo ADP-Glo™).

La figura 2 muestra la inhibición de la absorción de desoxiglucosa <sup>14</sup>C2 por células Jurkat frente a la concentración para PFK-158.

20 La figura 3 muestra la inhibición de la actividad enzimática de PFKFB3 en células Jurkat mediante la medición de los niveles de F2,6BP frente a la concentración para PFK-158.

La figura 4 muestra el perfil farmacocinético del tiempo frente a la concentración plasmática de PFK-158 en ratones BalbC (dosis IV, 5 mg/kg).

La figura 5 muestra el perfil farmacocinético del tiempo frente a la concentración plasmática de PFK-158 en ratas SD (dosis IV, 30 mg/kg).

25 La figura 6 muestra el volumen tumoral promedio en función del tiempo para los grupos de control y de tratamiento en el modelo de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC).

La figura 7 muestra el volumen tumoral promedio en función del tiempo para los grupos de control y de tratamiento en el modelo singénico de cáncer de colon murino CT-26.

30 La figura 8 muestra el volumen tumoral promedio en función del tiempo para los grupos de control y de tratamiento en el modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas Bx-PC3.

Descripción de las realizaciones

Los detalles de una o más realizaciones del tema descrito actualmente se exponen en este documento. Las modificaciones de las realizaciones descritas en este documento, y otras realizaciones, serán evidentes para los expertos en el arte después de un estudio de la información proporcionada en este documento.

35 Aunque se cree que los siguientes términos son bien comprendidos por un experto en el arte, se establecen las definiciones para facilitar la explicación del tema descrito actualmente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en el arte al que pertenece este tema descrito actualmente.

40 Siguiendo un convenio de ley de patentes de larga tradición, los términos "un", "uno" y "el" se refieren a "uno o más" cuando se usan en esta solicitud, incluyendo las reivindicaciones. De este modo, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células, y así sucesivamente.

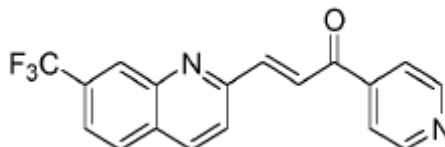
45 A menos que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como condiciones de reacción, y así sucesivamente, utilizados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones se deben entender como modificándose en todos los casos por el término "aproximadamente". De acuerdo con lo anterior, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretende obtener mediante el tema descrito actualmente.

El término "cáncer" tal como se utiliza en este documento se refiere a enfermedades causadas por la división celular no controlada y la capacidad de metástasis de las células, o para establecer un nuevo crecimiento en sitios adicionales. Los términos "maligno", "malignidad", "neoplasma", "tumor" y sus variaciones se refieren a células cancerosas o grupos de células cancerosas.

- 5 El término "agente contra el cáncer", "compuesto contra el cáncer", "compuesto antineoplásico", "agente antitumoral", "terapéutico contra el cáncer" y variaciones de los mismos como se usan en este documento se refieren a compuestos que pueden prevenir la proliferación de células cancerosas y tumores o destruir células cancerosas.

- 10 Tipos específicos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, glioblastoma multiforme, cánceres de piel, cánceres de tejido conectivo, cánceres de adiposo, cánceres de mama, cánceres de pulmón, cánceres de estómago, cánceres de páncreas, cánceres de órganos reproductores y de ovarios, cánceres de cuello uterino, cánceres de útero, cánceres anogenitales, cánceres del riñón, cánceres de vejiga, cánceres de hígado, cánceres colorrectales o de colon y cánceres de tracto digestivo (GI), cánceres de próstata y cánceres de órganos reproductivos, cánceres del sistema nervioso central (SNC), cáncer de la retina, cánceres de sangre, y linfoides, y cánceres de cabeza y cuello.

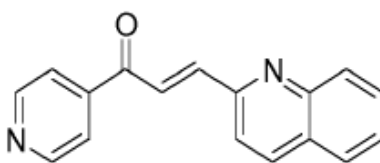
- 15 La 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 3, o PFKFB3, es una diana molecular para el desarrollo de terapéuticos contra el cáncer. Se ha descubierto ahora que el inhibidor de PFKFB3 (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona posee inesperadamente propiedades superiores en comparación con las quinolil-propenonas descritas anteriormente.



- 20 (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona (PFK-158)

(E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona, también denominada en este documento de manera intercambiable como PFK-158, presenta una eficacia superior imprevista *in vitro* contra la proteína diana PFKFB3 y células cancerosas, y una farmacodinámica superior, seguridad y eficacia *in vivo* en la inhibición tumoral.

- 25 Se ha descrito la 1-piridin-3-il-3-quinolin-3-il-propenona en la Patente de los Estados Unidos No. 8,088,385, concedida el 3 de enero de 2012 a Chesney, et al. Este compuesto, también denominado PFK-015, presenta una eficacia demostrada en estudios con ratones de tratamiento de tumores.



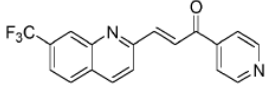
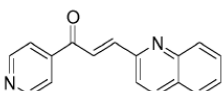
1-piridin-3-il-3-quinolin-3-il-propenona (PFK-015)

- 30 El PFK-158 difiere de PFK-015 por la adición de un sustituyente trifluorometilo en la posición 7 del anillo de quinolina. Sin embargo, las propiedades farmacéuticas de PFK-015, tales como solubilidad y estabilidad en solventes farmacéuticos generalmente reconocidos como seguros para la administración parenteral a pacientes con cáncer, hacen que este compuesto no sea apropiado para su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer.

- 35 Los estudios sugieren que, a pesar de las similitudes estructurales con PFK-015, el compuesto descrito inmediatamente presenta propiedades *in vitro* sorprendentemente superiores, propiedades farmacocinéticas *in vivo*, tolerabilidad *in vivo* y propiedades de seguridad e inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral. En general, estas propiedades superiores inesperadas indican que PFK-158 es un tratamiento de cáncer relativamente seguro y eficaz y enfermedades autoinmunes.

- 40 Los datos *in vitro* que comparan PFK-158 con PFK-015 muestran que PFK-158 presenta potencia superior inhibiendo la actividad enzimática de PFKFB3, inhibiendo la absorción de 2-desoxiglucosa y matando células cancerosas *in vitro*. Véase la tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Datos comparativos de IC<sub>50</sub> para PFK-158 frente a PFK-015

Compuesto	IC <sub>50</sub> , Actividad enzimática de PFKFB3, Ensayo ADP Glo™ <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> , Actividad enzimática de PFKFB3 en células <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> , Inhibición de la absorción de 2 desoxiglucosa <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> , toxicidad de la línea celular Jurkat (línea celular de leucemia) <sup>4</sup>
 PFK-158	137±15 nM	1.6±0.8 μM	0.8±0.1 μM	0.33±0.1 μM
 PFK-015	318±19 nM	4.7±1.6 μM	1.2±0.1 μM	0.8±0.1 μM

<sup>1</sup> Determinado usando el kit de ensayo ADP Glo™ disponible comercialmente (Promega, Madison, WI)

<sup>2</sup> La inhibición de PFKFB3 se mide en células mediante la medición de los niveles de fructosa-2,6-bisfosfonato de acuerdo con el método de Van Schaftingen (Eur. J. Biochem. 129:191 (1982)). Véase el ejemplo 2 para las condiciones experimentales.

<sup>3</sup> La inhibición de PFKFB3 en las células resulta en la inhibición de la absorción de glucosa por las células. Se desarrolló un ensayo para determinar la concentración que inhibe la absorción celular. Véase el ejemplo 2 para detalles experimentales.

<sup>4</sup> Véase el ejemplo 1 para detalles experimentales.

Los resultados de la tabla 1 ilustran que, sorprendentemente, el compuesto de la invención presenta una eficacia superior de dos veces o casi dos veces superior, cuando se compara con el PFK-015 estructuralmente similar.

- 5 Además, el PFK-158 también presenta propiedades farmacocinéticas inesperadas y superiores. Como se muestra en la tabla 2, los parámetros farmacocinéticos clave obtenidos en ratones Balbc del compuesto de la invención, tales como T<sub>1/2</sub> (semivida), C<sub>max</sub> (concentración máxima), AUC (área bajo la curva) o CI (eliminación), muestran que PFK-158 presenta una farmacocinética impredecible y superior en comparación con PFK-015 administrado en la misma concentración (dosificación IV). PFK-158 presenta una C<sub>max</sub> y una AUC más altas, una vida media más larga y una eliminación más baja en comparación con PFK-015.

10

Tabla 2: Parámetros farmacocinéticos

Compuesto	T <sub>1/2</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	AUC <sub>0-inf</sub> (ng.h/mL)	CI (mL/min/kg)
1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil) quinolin-2-il)prop-2-en1-ona (PFK-158)	10.5	4176	3235	26
1-Piridin-4-il-3-(quinolin-2-il)-propenona (PFK-015)	5.0	3053	1804	46

Además, la estabilidad *in vitro* de los compuestos anteriores en microsomas hepáticos humanos en función del tiempo ilustra que el compuesto de la invención es inesperadamente y significativamente más estable (una mejora casi doble de estabilidad). Véase la tabla 3, a continuación.

15

Tabla 3: Porcentaje metabolizado después de 1 h en microsomas hepáticos humanos

Compuesto	Porcentaje metabolizado después de 1 h
1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil) quinolin-2-il) prop-2-en1-ona (PFK-158)	37%

1-Piridin-4-il-3-(quinolin-2-il)-propenona (PFK-015)	67%
--	-----

5 Se realizaron varios estudios de dosis tolerada máxima y estudios toxicológicos y los resultados indicaron que PFK-158 es más seguro que PFK-015. Se realizaron estudios en ratones C57/B16 y en ratas SD. Las dosis máximas toleradas (DMT) fueron determinadas por ya sea una pérdida de peso corporal superior al 10% o por la muerte de los animales durante el estudio usando un horario de 3 días on/3 días off. Para PFK-158, no se alcanzó la DMT y de este modo se definió como >45 mg/kg, mientras que la DMT para PFK-015 fue significativamente menor, a 30 mg/kg. Véase la tabla 4, a continuación.

Tabla 4: Dosis máxima tolerada (DMT)

Compuesto	DMT
1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)prop-2-en-1-ona (PFK-158)	No alcanzado, >45 mg/kg
1-Piridin-4-il-3-(quinolin-2-il)-propenona (PFK-015)	30 mg/kg

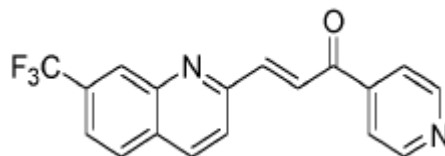
10 Se realizaron estudios toxicológicos en ratas SD que compararon PFK-158 y PFK-015 usando un programa de dosificación repetida. Los estudios se realizaron a niveles de dosis que oscilaban entre 5 y 30 mg/kg y los animales se controlaron determinando la pérdida de peso, el comportamiento, los signos clínicos y las químicas clínicas. Al final del estudio, se realizaron patología macroscópica e histopatología. No hubo observaciones adversas para PFK-158 para ninguna de las pruebas realizadas, lo que indica que PFK-158 fue muy bien tolerado y que la DMT sería superior a 30 mg/kg. El mismo estudio se realizó para PFK-015 a niveles de 2 dosis (12 y 25 mg/kg), y las observaciones adversas en ambos niveles de dosis incluyeron pérdida de peso corporal, disminución del consumo de alimentos, letargia clínica, aumento en recuentos de leucocitos, linfocitos y neutrófilos, hallazgos macroscópicos y microscópicos, hallazgos patológicos clínicos y la muerte. Basándose en estos resultados, se determinó que la DMT para PFK-015 en ratas era de 12 mg/kg. La diferencia en los valores de DMT entre los dos compuestos es inesperada y no se predijo a partir de los perfiles farmacocinéticos. Los estudios de toxicología indican que PFK-158 es significativamente más seguro que el PFK-015 estructuralmente similar.

25 Se realizaron estudios que determinaron la eficacia de PFK-158 en la inhibición del crecimiento tumoral en modelos de cáncer de ratón. Estos estudios se llevaron a cabo con PFK-158 solo y en combinación con compuestos utilizados actualmente en el tratamiento de pacientes con cáncer. Los estudios se realizaron en un modelo de cánceres de pulmón, un modelo de cáncer de páncreas, y en un modelo de cáncer de colon. En cada caso, el compuesto de la invención mostró una actividad significativa con una inhibición del crecimiento tumoral que oscila entre 50% y 70%, actividad antitumoral comparable a los controles usados en esos estudios (agentes quimioterapéuticos usados clínicamente para tratar estos tipos de tumores tales como paclitaxel, gemcitabina e irinotecano), sin pérdida notable de peso corporal o muerte (véase el ejemplo 4 y las figuras 6-8). Los animales tratados con PFK-015 presentaron una actividad similar pero el tratamiento no fue tan bien tolerado, ya que se observó una pérdida de peso corporal superior al 15%, junto con otras observaciones clínicas que indicaban efectos secundarios adversos. PFK-158 es mejor tolerado y más seguro que el PFK-015 estructuralmente similar. Este beneficio de tolerabilidad es significativo, ya que permite la combinación de diferentes compuestos contra el cáncer para aumentar la inhibición del crecimiento tumoral sin aumentar los efectos secundarios letales que minimizan los beneficios de tales combinaciones.

40 Además, las propiedades de solubilidad de PFK-158 son tales que, si se requiere, el compuesto se puede administrar usando una emulsión basada en fosfolipídica acuosa, o en una solución acuosa libre de emulsión, sin solvente. Sorprendentemente, el compuesto de acuerdo con la invención no experimenta en la formulación mencionada anteriormente una rápida fotoisomerización en estas soluciones. Por lo tanto, el beneficio añadido inesperado simplifica la administración a pacientes que sufren de cáncer o una enfermedad autoinmune y no necesariamente requiere tubos de color ámbar o sobre-bolsas para reducir la exposición a los rayos UV.

#### I. Compuesto

En una realización, se proporciona el compuesto (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona, Que tiene la siguiente fórmula estructural:



e incluye cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos o metabolitos farmacéuticamente aceptables.

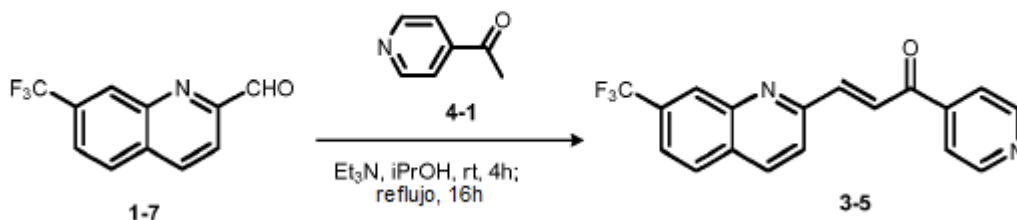
## II. Síntesis química

- 5 (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona, o PFK-158, se prepara usando los métodos generales descritos a continuación en los esquemas I o II, junto con métodos sintéticos conocidos para los expertos en el arte de síntesis orgánica y variaciones en los mismos.

10 Como se describe en resumen en los siguientes esquemas, el compuesto de la invención se puede preparar mediante la reacción del aldehído de quinolina correspondiente con el correspondiente derivado de acetilo no sustituido en presencia de una base apropiada. Alternativamente, el aldehído también se puede hacer reaccionar con un derivado de fosforilideno para dar el producto deseado.

A continuación, se describen dos esquemas sintéticos detallados para la preparación del compuesto de la invención.

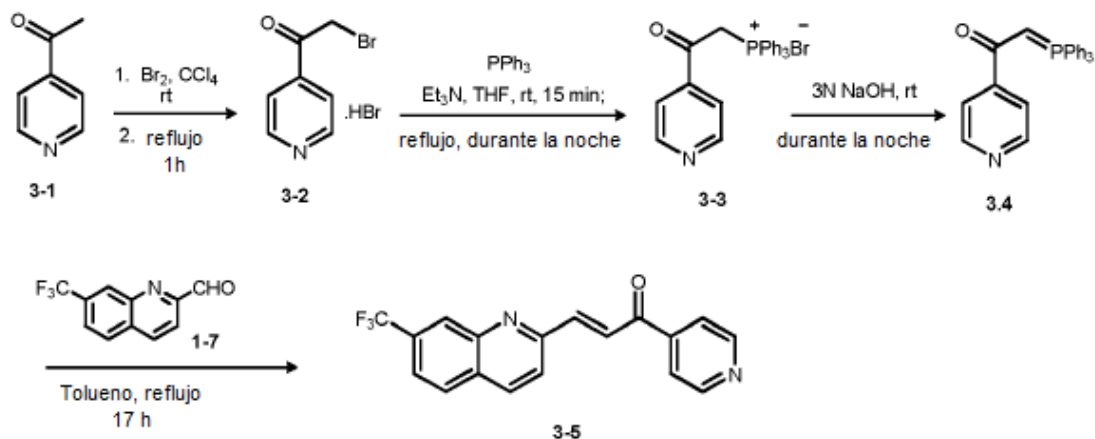
### Esquema 1:



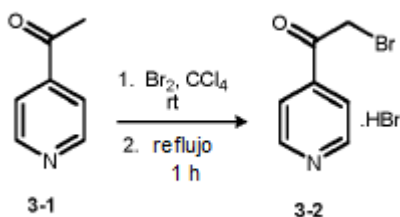
Preparación de la 1-Piridin-4-il-3-[7-trifluorometil]quinolin-2-il]prop-2-en-1-ona (3-5):

- 15 Se adicionó trietilamina (0.96 mL, 6.6 mmol, 0.5 eq) a la mezcla de 7-(trifluorometil)quinolina-2-carbaldehído (1-7) (3 g, 13.32 mmol) y 4-acetilpiridina (4-1) (1.93 g, 15.98 mmol, 1.2 eq.) en alcohol isopropílico (75 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, durante 4 h a continuación, se calentó a reflujo, durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró a 35 mL y se enfrió a 0°C. El producto precipitado se recolectó por filtración, se lavó bien con alcohol isopropílico enfriado (5 x 2 mL) y se secó al vacío para dar el compuesto 3-5 (1.47 g, 33%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.90 (d, J = 5.40 Hz, 2H), 8.66 (d, J = 8.70 Hz, 1H), 8.42-8.36 (m, 2H), 8.33-8.26 (m, 2H), 8.02 (d, J = 5.40 Hz, 2H), 7.95-7.87 (m, 2H). Pureza por HPLC (% de área): 100% en 1000 ppm en DMSO.
- 20

## Esquema 2:

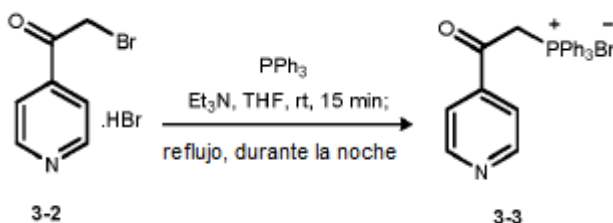


Preparación de hidrobromuro 2-bromo-1-piridin-4-il-etanona (3-2):



- 5 Se adicionó lentamente bromuro (131.92 g, 825.49 mmol) a temperatura ambiente a una solución agitada de 3-1 (100 g, 825.491 mmol) en  $\text{CCl}_4$  (2.5 L). A continuación, la mezcla de reacción se calentó lentamente a refluxo, durante 1h [reacción es exotérmica y puede ser vigorosa una vez que alcanza los  $72^\circ\text{C}$ ]. El producto se precipitó como sólido de color amarillo. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el producto se recolectó por filtración, se lavó tres veces con éter dietílico (1.5 L en total) y se secó para obtener el compuesto 3-2 (234.6 g).

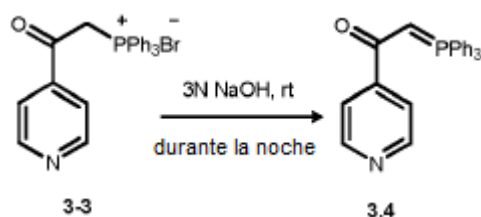
- 10 Preparación del bromuro de (2-oxo-2-piridin-4-il-etil)-trifenil-fosfonio (3-3)



- 15 Se adicionó trifenilfosfina (219.46 g, 836.72 mmol) en THF desoxigenado (5 L) a temperatura ambiente en seis porciones iguales a una suspensión fina de 3-2 (234 g, 835.05 mmol) en THF (2 L) bajo una atmósfera de nitrógeno. A continuación, se adicionó a temperatura ambiente trietilamina (84.49 g, 835.05 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y a continuación se calentó a refluxo, durante la noche con agitación vigorosa. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. El sólido de color marrón claro precipitado se recolectó por filtración, se lavó tres veces con éter dietílico (1.5 L en total) y se secó para dar el compuesto 3-3 (385.85 g).

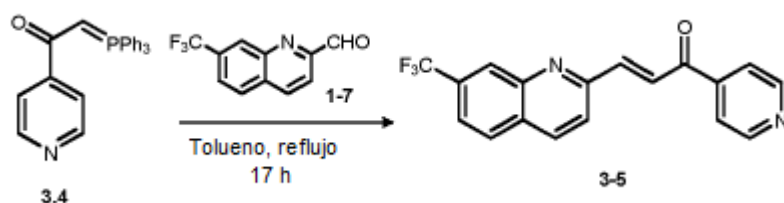
Preparación de la 1-piridin-4-il-2-(trifenil- $\lambda^5$ -fosfanilideno)etanona (3-4)





5 Se adicionó lentamente a temperatura ambiente solución acuosa 3N de hidróxido de sodio (2.85 L) a una solución de 3-3 (385.85 g, 834.59 mmol) en un sistema de solvente mixto de metanol (0.762 L) y agua destilada (1.43 L) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El metanol se evaporó bajo presión reducida y el producto resultante en el residuo acuoso se recolectó por filtración, se lavó con agua destilada (2 L) y éter dietílico (1.5 L) y se secó para dar el producto 3-4 (115 g, 36%) como un sólido de color marrón.

Preparación de la 1-piridin-4-il-3-[7-(trifluorometil)quinolin-2-il]prop-2-en-1-ona (3-5):



10 Se adicionó a temperatura ambiente 7-(trifluorometil)quinolina-2-carbaldehído 1-7 (50 g, 222 mmol) a una solución de 3-4 (84.6 g, 0.222 mol) en tolueno (1L). La mezcla de reacción se calentó lentamente a reflujo y se mantuvo a reflujo durante 17 h (el progreso de la reacción se controló por TLC y espectroscopía de masas). El tolueno se separó por destilación bajo presión reducida y el residuo se cristalizó en etanol caliente dando 3-5 puro (46.14g, 63.3%). MS calculado para  $C_{18}H_{14}N_2O_2$  (M+H<sup>+</sup>) 329.3 fue encontrado 329.3. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.90 (d, J = 5.40 Hz, 2H), 8.66 (d, J = 8.70 Hz, 1H), 8.42-8.36 (m, 2H), 8.33-8.26 (m, 2H), 8.02 (d, J = 5.40 Hz, 2H), 7.95-7.87 (m, 2H). Pureza por HPLC 99.74% (% de área).

### III. Composiciones farmacéuticas

(E)-1-(piridin-4-il)-3-[7-(trifluorometil)quinolin-2-il]-prop-2-en-1-ona (PFK-158), incluyendo sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden administrar a un sujeto ya sea solo, o como parte de una composición farmacéutica.

20 También se proporcionan en este documento composiciones farmacéuticas que comprenden PFK-158. Estas composiciones farmacéuticas comprenden PFK-158 en un portador farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones farmacéuticas se pueden preparar para administración intravenosa o parenteral, como se describe con mayor detalle a continuación. Además, PFK-158 se puede reconstituir para formar composiciones farmacéuticamente aceptables (incluyendo composiciones farmacéuticamente aceptables en humanos) para administración.

El término "portador", como se utiliza en este documento, incluye portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos en las dosificaciones y concentraciones empleadas.

30 La dosificación terapéuticamente eficaz de PFK-158 para su uso de acuerdo con las realizaciones descritas en este documento variará algo de sujeto a sujeto y dependerá de la condición del sujeto y la ruta de administración. Como una proposición general, una dosificación desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 500 mg/kg tendrá eficacia terapéutica, con todos los pesos calculándose sobre la base del peso del compuesto activo, incluyendo los casos en los que se emplea una sal.

35 De acuerdo con los usos descritos en este documento, PFK-158 se puede administrar por vía intramuscular, subcutánea, intraarterial o intravenosa como una solución, suspensión o emulsión. Alternativamente, el compuesto o sus sales también se pueden administrar por vía intravenosa, intraarterial o intramuscular como una suspensión liposomal.

40 Las composiciones farmacéuticas apropiadas para inyección intravenosa o intramuscular son realizaciones adicionales proporcionadas en este documento. Si se desea una solución, el agua es el portador de elección. Con respecto a las soluciones acuosas, puede ser apropiado un emulsionante y/o un vehículo orgánico

farmacéuticamente aceptable, tal como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, o mezclas de los mismos. Si se requiere un emulsionante para mantener la solución o emulsión estable, a continuación, los emulsionantes tales como, pero no limitados a, derivados de aceite de ricino polietoxilado y conocidos como Cremophor®, RH 40 Cremophor® y todos sus derivados, de sorbitán polietoxilado y ácido oleico y conocidos como Tween 60 u 80®, Polysorbate 60 u 80® y todos sus derivados, a partir de alfa-tocoferol y derivados, pueden ser apropiados. El uso de moléculas que forman complejos de inclusión como la ciclodextrina, tales como Captisol® o Kleptose®, permite obtener una formulación basada en agua sin solventes ni emulsionantes. En cualquier caso, las soluciones preparadas pueden ser esterilizadas de una manera apropiada conocida para los expertos en el arte, y por lo general por filtración a través de un filtro de 0.22 micrómetros. Después de la esterilización, la solución se puede dispensar en recipientes apropiados, tales como viales de vidrio despirogenado. La dispensación se realiza preferiblemente por un método aséptico. Los cierres esterilizados se pueden colocar entonces en los viales y, si se desea, se puede liofilizar el contenido del vial.

Además del compuesto de la invención, incluyendo sus sales farmacéuticamente aceptables, las composiciones farmacéuticas pueden contener otros aditivos, tales como aditivos que ajusten el pH. En particular, los agentes útiles de ajuste del pH incluyen ácidos, tales como ácido clorhídrico, bases o soluciones reguladoras, tales como lactato de sodio, acetato de sodio, fosfato de sodio, citrato de sodio, borato de sodio o gluconato de sodio. Además, las composiciones pueden contener conservantes antimicrobianos. Los conservantes antimicrobianos útiles incluyen metilparabeno, propilparabeno y alcohol bencílico. El conservante antimicrobiano se emplea por lo general cuando la formulación se coloca en un vial diseñado para uso multidosis. Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento se pueden liofilizar usando técnicas bien conocidas en la técnica.

En incluso otro ejemplo se proporciona una formulación estéril, inyectable, estable, que comprende PFK-158 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una forma de dosificación unitaria en un recipiente sellado. El compuesto se proporciona en forma de un liofilizado, que es capaz de ser reconstituido con un portador farmacéuticamente aceptable apropiado para formar una formulación líquida apropiada para su inyección en un sujeto. La forma de dosificación unitaria comprende por lo general de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 10 gramos de la sal del compuesto.

Ejemplos adicionales proporcionados en este documento incluyen formulaciones liposomales del compuesto activo descrito en este documento. La tecnología para formar suspensiones liposomales es bien conocida en la técnica.

#### IV. Métodos para inhibir la proliferación celular y tratar el cáncer

(E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona (PFK-158) y composiciones que incluyen el compuesto son útiles para inhibir la proliferación celular y/o tratar el cáncer.

Se describen métodos para inhibir la proliferación celular o tratar un cáncer, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite el compuesto contra el cáncer, PFK-158 como se describe en este documento. El compuesto activo, como se ha expuesto anteriormente, incluye el compuesto y sus sales farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el compuesto activo está presente en una formulación farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

El compuesto actualmente descrito puede proporcionar terapia para una amplia variedad de tumores y cánceres incluyendo, pero sin limitarse a, glioblastoma multiforme, cánceres de piel, cánceres de tejido conectivo, cánceres de adiposo, cánceres de mama, cánceres de pulmón, cánceres de estómago, cánceres de páncreas, cánceres de órganos reproductores y de ovarios, cánceres de cuello uterino, cánceres de útero, cánceres anogenitales, cánceres del riñón, cánceres de vejiga, cánceres de hígado, cánceres colorrectales o de colon y cánceres de tracto digestivo (GI), cánceres de próstata y cánceres de órganos reproductivos, cánceres del sistema nervioso central (SNC), cáncer de la retina, cánceres de sangre, y linfoides, y cánceres de cabeza y cuello.

Una "cantidad eficaz" como se define en este documento en relación con el tratamiento de cánceres es una cantidad que disminuirá, reducirá, inhibirá o anulará de otro modo el crecimiento de una célula o tumor de cáncer. El compuesto descrito en este documento se puede administrar regionalmente a una región o regiones afectadas particulares del cuerpo del sujeto. En el cual se considera que dicho tratamiento es más apropiado, el compuesto se puede administrar sistemáticamente. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar por vía intravenosa.

Además, se apreciará que los beneficios terapéuticos para el tratamiento del cáncer se pueden realizar combinando el tratamiento con uno o más agentes o tratamientos contra el cáncer adicionales. La elección de tales combinaciones dependerá de diversos factores incluyendo, pero no limitándose al tipo de enfermedad, la edad y la salud general del sujeto, la agresividad de la progresión de la enfermedad y la capacidad del sujeto para tolerar los agentes que comprenden la combinación.

De este modo, se puede usar una variedad de compuestos químicos, también descritos como "agentes contra el cáncer" o "agentes quimioterapéuticos" en combinación con PFK-158. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, intercaladores de ADN, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores de la síntesis de

ADN o ARN, análogos de bases de ADN, inhibidores de topoisomerasa, agentes antiangiogénesis e inhibidores de la telomerasa o compuestos de unión telomérica al ADN. Por ejemplo, agentes alquilantes apropiados incluyen alquil sulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodizepa, carbocouona, meturedpa y uredepa; etileniminas y metilmelaminas, tales como altretramina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolmelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloramina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina.

Los antibióticos utilizados en el tratamiento del cáncer incluyen dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, idarubicina, sulfato de bleomicina, mitomicina, plicamicina y estreptozocina. Los antimetabolitos quimioterapéuticos incluyen mercaptopurina, tioguanina, cladribina, fosfato de fludarabina, fluorouracilo (5-FU), floxuridina, citarabina, pentostatina, metotrexato y azatioprina, aciclovir, adenina β-1-D-arabinósido, ametofterina, aminopterina, 2-aminopurina, afidicolina, 8-azaguanina, azaserina, 6-azauracilo, 2'-azido-2'-desoxinucleósidos, 5-bromodesoxicitidina, β-1-D-arabinósido de citosina, diazoxinorleucina, didesoxinucleósidos, 5-fluorodesoxicitidina, 5-fluorodesoxiuridina e hidroxiurea.

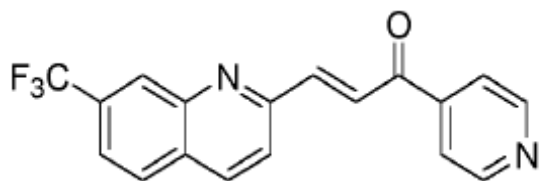
Los inhibidores de la síntesis de proteínas quimioterapéuticas incluyen abrina, ácido aurintricarboxílico, cloranfenicol, colicina E3, cicloheximida, toxina diftérica, edeína A, emetina, eritromicina, etionina, fluoruro, 5-fluorotriptófano, ácido fusídico, guanilil metilendifosfonato y guanililimidodifosfato, kanamicina, kasugamicina, kirromicina y O-metil treonina. Los inhibidores adicionales de la síntesis de proteínas incluyen modicina, neomicina, norvalina, pactamicina, paromomicina, puromicina, ricina, toxina shiga, showdomicina, esparsomicina, espectinomina, estreptomina, tetraciclina, tiostrepton y trimetoprim. Inhibidores de la síntesis de ADN, incluyendo agentes alquilantes tales como sulfato de dimetilo, mitomicina C, mostazas de nitrógeno y azufre, agentes intercalantes, tales como colorantes de acridina, actinomocinas, adriamicina, antracenos, benzopireno, bromuro de etidio, entrelazamiento de dióxido de propidio y agentes tales como distamicina y netropsina, también se pueden combinar con PFK-158 en composiciones farmacéuticas. Inhibidores de la topoisomerasa, tales como coumermicina, ácido nalidíxico, novobiocina y ácido oxolínico, inhibidores de la división celular, incluyendo colcemida, colquicina, vinblastina y vincristina; y los inhibidores de la síntesis de ARN, incluyendo actinomocina D, α-amanitina y otras amatoxinas fúngicas, cordicepina (3'-desoxiadenosina), diclororibofuranosilbenzimidazol, rifampicina, estreptovaricina y estreptolidigina también se pueden combinar con el PFK-158 para proporcionar un tratamiento apropiado contra el cáncer.

De este modo, los agentes contra el cáncer actuales que pueden usarse en un tratamiento de combinación con PFK-158 incluyen, pero no se limitan a, adrimicina, 5-fluorouracilo (5FU), etopósido, camptotecina, actinomocina-D, mitomicina, cisplatino, peróxido de hidrógeno, carboplatino, oxaliplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, bisulfano, nitrosourea, dactinomocina, duanorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, tamoxifeno, paclitaxel, docetaxel, transplatino, vinblastina, vincristina, metotrexato, irinotican, leucovorina, bevacizumab, cetuximab, sunitinib, imatinib, temozolomida, gemcitabina y similares.

Los tratamientos de combinación que implican el compuesto de la presente invención se pueden ensayar y se puede conseguir otro agente terapéutico, tal como otro agente quimioterapéutico, utilizando ambos agentes sustancialmente al mismo tiempo. Alternativamente, el tratamiento con el compuesto de la presente invención puede preceder o seguir el tratamiento con el otro agente por intervalos que van desde minutos a semanas.

Un modo de administración de agentes quimioterapéuticos es por administración parenteral, que requiere la solubilidad del agente en solventes apropiados para administración parenteral. Ejemplos no limitativos de solventes o mezclas de solventes apropiados incluyen Cremophor, Tween, polietilenglicol y/o polipropilenglicol en combinación con soluciones parenterales tales como solución salina (cloruro de sodio al 0.9% en agua para inyección), D5W o D10W (5% o 10 respectivamente, glucosa o dextrosa en agua para inyección), y lactato Ringer.

De acuerdo con lo anterior, en una realización, se proporciona un compuesto para el tratamiento del cáncer, que consiste en (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el compuesto que tiene la fórmula:



En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer, que comprende: (a) una cantidad eficaz de (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal

farmacéuticamente aceptable del mismo; y (b) al menos un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, la composición comprende adicionalmente un segundo agente contra el cáncer. En ciertas realizaciones, el segundo agente contra el cáncer se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, doxorubicina, vincristina, vinblastina, 5-FU, irinotcano, metotrexato, leucovorina, bevacizumab, cetuximab, sunitinib, imatinib, temozolomida y gemcitabina. Tales composiciones farmacéuticas son útiles en el tratamiento de diversos cánceres tratables por inhibición de PFKFB3, incluyendo glioblastoma multiforme, cánceres de piel, cánceres de tejido conectivo, cánceres de adiposo, cánceres de mama, cánceres de pulmón, cánceres de estómago, cánceres de páncreas, cánceres de órganos reproductores y de ovarios, cánceres de cuello uterino, cánceres de útero, cánceres anogenitales, cánceres del riñón, cánceres de vejiga, cánceres de hígado, cánceres colorrectales o de colon y cánceres de tracto digestivo (GI), cánceres de próstata y cánceres de órganos reproductivos, cánceres del sistema nervioso central (SNC), cáncer de la retina, cánceres de sangre, y linfoides, y cánceres de cabeza y cuello.

Se describe un método para tratar el cáncer, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El método puede ser útil en el tratamiento de diversos cánceres tratables por inhibición de PFKFB3, incluyendo glioblastoma multiforme, cánceres de piel, cánceres de tejido conectivo, cánceres de adiposo, cánceres de mama, cánceres de pulmón, cánceres de estómago, cánceres de páncreas, cánceres de órganos reproductores y de ovarios, cánceres de cuello uterino, cánceres de útero, cánceres anogenitales, cánceres del riñón, cánceres de vejiga, cánceres de hígado, cánceres colorrectales o de colon y cánceres de tracto digestivo (GI), cánceres de próstata y cánceres de órganos reproductivos, cánceres del sistema nervioso central (SNC), cáncer de la retina, cánceres de sangre, y linfoides, cánceres de cabeza y cuello, y similares. En un ejemplo adicional, el método comprende adicionalmente la administración de un segundo agente contra el cáncer. El segundo agente contra el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, doxorubicina, vincristina, vinblastina, 5-FU, irinotican, metotrexato, leucovorina, bevacizumab, cetuximab, sunitinib, imatinib, temozolomida y gemcitabina. El segundo agente contra el cáncer se puede coadministrar con (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona, o se puede administrar antes o después (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona.

En otra realización, se proporciona un compuesto para uso en el tratamiento de un tumor, comprendiendo el uso la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad eficaz de (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización adicional, el uso comprende adicionalmente la administración de un segundo agente contra el cáncer. En realizaciones específicas, el segundo agente contra el cáncer se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, doxorubicina, vincristina, vinblastina, 5-FU, irinotcano, metotrexato, leucovorina, bevacizumab, cetuximab, sunitinib, imatinib, temozolomida y gemcitabina. El segundo agente contra el cáncer se puede coadministrar con (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona, o se puede administrar antes o después (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona.

En incluso otra realización, se proporciona un método *in vitro* para inhibir el flujo glucolítico en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización, se proporciona un método *in vitro* para inhibir la actividad enzimática de PFKFB3 en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Estas y otras realizaciones se entenderán más a la luz de los siguientes ejemplos.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se dan a título ilustrativo solamente y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

#### Ejemplo 1

##### Inhibición de la proliferación de células cancerosas

Se midió la capacidad de PFK-158 para destruir o inhibir la proliferación de células cancerosas utilizando el ensayo MTT, el ensayo alamarBlue® (Invitrogen, Grand Island, NY) o el ensayo CellTiter Glo™ (Promega, Madison, WI) usando exposición de 48 o 72 horas. Los resultados del ensayo de MTT de diferentes líneas celulares de cáncer se muestran en la tabla 5 a continuación y demuestran que PFK-158 inhibe la proliferación de células cancerígenas a bajas concentraciones nanomolar a través de varios tipos de líneas celulares de cáncer.

Las células de la línea celular tumoral deseada se sembraron en placa a  $2 \times 10^5$  células/mL en placas de 96 pozos. Dos veces las concentraciones indicadas de los compuestos de la invención se adicionaron a las células al día

siguiente en un volumen igual de medio. 72 horas más tarde, las células se lisaron y se sometieron a determinación de ATP usando el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo™. Los experimentos se realizaron por triplicado. Cuando se utiliza el ensayo MTT o el ensayo alamarBlue®, las condiciones experimentales son esencialmente similares; al final del período de incubación, se adicionan 20 microlitros de la solución de MTT por pozo y las muestras se incuban durante cuatro horas adicionales, se aclaran y se mide la absorbancia a 570 nm. Los resultados para la inhibición de la proliferación celular se describen como IC<sub>50</sub> (la concentración que resulta en 50% de inhibición de la proliferación de la población celular) y se enumeran en la tabla 5 a continuación. Las líneas celulares incluyen las líneas de cánceres de pulmón, colon, próstata, mama, ovario y pancreático.

**Tabla 5: valores de IC<sub>50</sub> para PFK-158 (ensayo MTT, 48 horas) en un panel de líneas celulares**

Línea celular	IC <sub>50</sub> (nM)
A498	3512
A549	8654
HCT116	3399
HT29	4134
MiaPaCa-2	3353
SKOV-3	2625
SW620	2668
PC-3	1180
BT474	1952
SK-BR-3	1598

## 10 Ejemplo 2

Inhibición de PFKFB3 recombinante, PFKFB3 en células y absorción de glucosa en células

La enzima 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa2,6-bifosfatasa bifuncional inducible (PFKFB3) se expresó y purificó con el fin de determinar si PFK-158 inhibe la actividad enzimática. Se preparó PFKFB3 por expresión en *E. coli* y se purificó mediante columna de GST y cromatografía en columna. Los gels de tinción coumassie SDS Page indicaron que la pureza era alta (>95%). La proteína recombinante fue pura y activa según se determinó mediante los resultados de un ensayo de actividad de quinasa comercialmente disponible (ADP-Glo™, Promega, Madison, WI). El mismo ensayo se usó para determinar la inhibición de la proteína y los resultados se muestran en la figura 1, que representa la curva inhibitoria para PFK-158, dando como resultado una IC<sub>50</sub> de 137 ± 15 nM.

La inhibición de PFKFB3 también se puede medir en células mediante la medición de los niveles de fructosa-2,6-bifosfato según el método de Van Schaftingen (*Eur. J. of Biochem*, 129: 191(1982)). Este método permite la medición de la inhibición en un entorno celular, un modelo más relevante que la proteína recombinante pura. En resumen, las células Jurkat se sembraron en placas a 1x10<sup>5</sup> células/mL y se incubaron con diferentes concentraciones de PFK-158 durante 3 horas. Se recogieron las muestras y se lisaron las células. Los extractos se caracterizaron como se describe en informes anteriores y se normalizaron a la concentración de proteínas. Los resultados muestran que PFK-158 tiene una IC<sub>50</sub> de 1.6 ± 0.8 μM. Véase la figura 3.

La inhibición de PFKFB3 da como resultado la inhibición de la glucólisis. Existen varios mecanismos de activación e inhibición de retroalimentación o de inhibición, de manera que, mediante un mecanismo de retroalimentación, la inhibición de la actividad de PFKFB3 puede inhibir la absorción de glucosa por las células. Se desarrolló un ensayo para determinar si había inhibición de la absorción de glucosa después de la exposición PFK-158. En resumen, las células Jurkat se sembraron en placas a 10<sup>5</sup> células/mL en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y sulfato de gentamicina 50 μg/mL. Las células se trataron inmediatamente con vehículo o 0.5 μmol/L de PFK-158 durante 3 horas y posteriormente se colocaron en RPMI 1640 sin glucosa, durante 30 min. Se adicionó <sup>14</sup>C-2-desoxiglucosa (0.25 μCi/mL, Perkin Elmer) durante 60 min adicionales y las células se lavaron luego tres veces con RPMI 1640 enfriado con hielo que no contenía glucosa. Los lisados celulares se recogieron en 500 μL de SDS al 0.1% y se midieron los recuentos de centelleo (recuentos/min) en 400 μL de lisado. Los recuentos se normalizaron a

la concentración de proteínas. Los resultados indican que PFK-158 tiene una IC<sub>50</sub> de 847 ± 150 nM. Véase la figura 2.

Estos resultados confirmaron que el compuesto de la invención es un potente inhibidor de PFKFB3 y tiene IC<sub>50</sub> nanomolares bajas como se resume en la tabla 6 a continuación.

5 Tabla 6 IC<sub>50</sub> (nM) para PFK-158 (células Jurkat)

PFKFB3 Rec	PFKFB3 celular (F2,6BP)	Absorción de glucosa	Crecimiento celular
137±15	1620±400	847±150	328±15

Ejemplo 3

Farmacocinética

10 Los parámetros farmacocinéticos (PK) para PFK-158 se determinaron en ratones después de la administración IV (intravenosa) en ratones y ratas. Un diseño de estudio típico incluye seis animales (macho o hembra) de 7 a 8 semanas.

15 Se determinaron las propiedades farmacocinéticas del ratón usando una dosis de 5 mg/kg después de la administración IV usando una solución de DMSO al 10%, PEG-200 al 10%, Solutol al 10%: etanol (1:1) y D5W al 70% o cualquier otra formulación parenteral farmacéuticamente aceptable. Se recogieron muestras de sangre a intervalos diferentes. Las muestras de plasma se extrajeron y se analizaron utilizando un método LC-MS/MS. Se usaron protocolos similares para el estudio de PK de rata (ratas Sprague Dawley, 30 mg/kg), aunque la formulación para estudios de PK de rata difería (solución de captisol al 30%, pH 3.0). Se prepararon diagramas de tiempo frente a concentraciones plasmáticas como se muestra en las figuras 4 (ratones BalbC) y 5 (ratas SD), respectivamente. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon y se proporcionan a continuación en la tabla 7.

Tabla 7: Parámetros PK (dosificación IV; 5 mg/kg en ratones Balbc; 30 mg/kg en ratas Spranque Dawley).

	T <sub>1/2b</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	AUC <sub>0-inf</sub> (ng.h/ml)
Ratón (5 mg/kg)	10.4	4,176	3,235
Rata (30 mg/kg)	8.6	18,883	3,298

20 Los resultados muestran que el compuesto de la invención tiene una semivida razonablemente larga que soporta la exposición durante un largo periodo de tiempo, una concentración máxima alta y una AUC elevada, que soportan alta concentración de fármaco y exposición.

Ejemplo 4

25 Estudios de eficacia

30 La eficacia de PFK-158 se estudió *in vivo* en modelos tumorales. En estos estudios se utilizaron varios modelos de tumores (el carcinoma de pulmón de Lewis o el modelo LLC, el modelo de tumor de carcinoma de colon CT-26 o el modelo de cáncer de páncreas BXP3). El protocolo experimental para el estudio de LLC se describe a continuación. Después de la inoculación subcutánea de células tumorales, los tumores comenzaron a desarrollarse y una vez que los tumores alcanzaron el volumen deseado de 100-125 mm<sup>3</sup> en promedio, se inició el tratamiento. Se

controló el volumen tumoral en ambos grupos y se midió el promedio de tanto los grupos de control como de tratamiento tres veces por semana, así como los pesos corporales.

En resumen, se usaron ratones C57BL/6 femeninos normales de 7-8 semanas para el estudio. Los ratones se alojaron en una jaula microisolador, con alimento y agua proporcionados como opcional, y se pusieron en cuarentena durante 4 días antes del inicio del estudio. Las células LLC se mantuvieron en un cultivo monocapa en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina y L-glutamina (2 mM) a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en el aire. Las células tumorales se subcultivaron rutinariamente dos veces por semana. Las células que crecen en una fase exponencial se cosecharon y se contaron para la inoculación del tumor. Cada ratón se inoculó por vía subcutánea en el flanco derecho con las células tumorales LLC (3 x 10<sup>5</sup>) en 0.1 ml de PBS para el desarrollo del tumor. Cuando se usaron ratones desnudos atímicos, como para el modelo BxPC3, a continuación, la cepa de ratones es ligeramente diferente. Además, el uso de Matrigel apoya el desarrollo de tumores, lo que significa que las células se suspenden en 100 µl de una mezcla de medio/Matrigel (1:1) y luego se implantan por vía subcutánea en la región del flanco derecho. Los animales fueron se controlaron para determinar el crecimiento del tumor diariamente después de la implantación celular. Cuando los volúmenes del tumor alcanzaron aproximadamente 100-125 mm<sup>3</sup>, los ratones se asignaron al azar a grupos de 8 ratones cada uno usando solamente ratones que tenían volúmenes tumorales más cercanos al valor medio. Los volúmenes de tumores se midieron usando la fórmula  $V = L \times W \times H \times \pi/6$ , donde L y W representan los diámetros más largo y más corto del tumor y H representa la altura del tumor. El tratamiento comenzó después de la aleatorización. Se administró IP el PFK-158 a una dosis de 60 mg/kg los días 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13. Se observaron animales para el posible efecto tóxico del tratamiento con fármaco. Los pesos corporales se registraron y mostraron que el compuesto era muy bien tolerado, sin pérdida notable de peso corporal. Los resultados se muestran en la figura 6.

Se usaron protocolos similares para los otros estudios usando diferentes modelos; las diferencias incluyeron el uso de ratones Balbc/desnudos; administrar un mayor número de células cancerosas; y uso de Matrigel. Los resultados de varios estudios se muestran en las figuras 6-8 y demuestran que el compuesto de la invención inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en diferentes tipos de tumores, siendo muy bien tolerado, sin pérdida de peso corporal observable ni muerte animal. Además, se observó un efecto aditivo o sinérgico cuando se combina PFK-158 con otros agentes quimioterapéuticos.

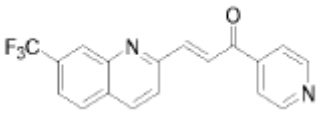
Ejemplo 5

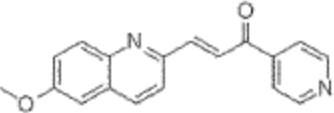
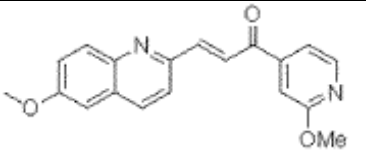
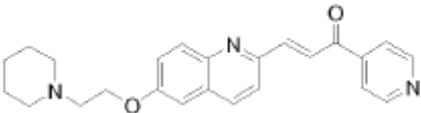
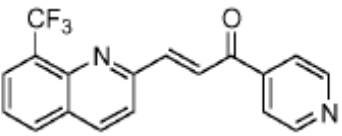
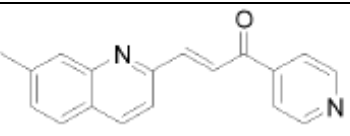
30 Comparación de PFK-158 con compuestos de quinolil-propenona

Se usaron los mismos métodos detallados en la tabla 1 anterior para comparar PFK-158 con cinco compuestos de quinolilpropenona estructuralmente similares, que portaban grupos funcionales en el armazón de PFK-015: 1-Piridin-4-il-3-(quinolin-2-il)-propenona, 3-(6-metoxi-quinolin-2-il)-1-piridin-4-il-propenona (PFK-138), 1-(2-metoxi-piridin-4-il)-3-(6-metoxi-quinolin-2-il)-propenona (PFK-144), 3-(6-(2-piperidin-1-il-etoxi)-quinolin-2-il)-1-piridin-4-il-propenona (PFK-150), 1-Piridin-4-il-3-(8-trifluorometil-quinolin-2-il)-propenona (PFK-153), y 3-(7-Metil-quinolin-2-il)-1-piridin-4-il-propenona (PFK-154).

Los resultados muestran que PFK-158 presenta una inhibición *in vitro* superior de PFKFB3 y 2 desoxiglucosa y una eficacia superior contra células Jurkat, cuando se compara con cada una de las variantes de quinolil-propenona enumeradas de PFK-015. En muchos casos, el PFK-158 mostró un rendimiento mejorado de dos a seis veces en comparación con los compuestos ensayados. Véase la tabla 8, a continuación.

Tabla 8: Comparación de IC<sub>50</sub> de PFK-158 con compuestos de quinolil-propenona

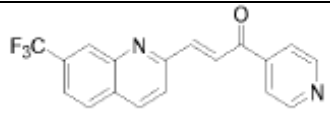
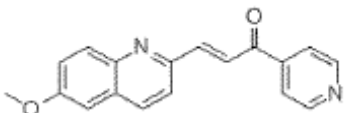
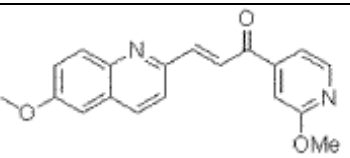
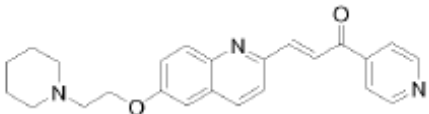
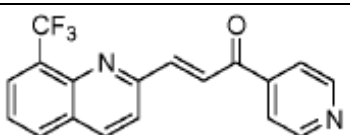
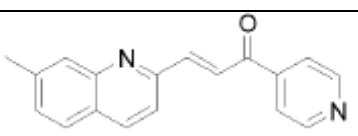
Compuesto	IC <sub>50</sub> , Actividad enzimática de PFKFB3, Ensayo ADP Glo™	IC <sub>50</sub> , Actividad enzimática de PFKFB3 en células	IC <sub>50</sub> , Inhibición de la absorción de 2 desoxiglucosa	IC <sub>50</sub> , toxicidad de la línea celular Jurkat (línea celular de leucemia)
 <p>PFK-158</p>	137±15 nM	1.6±0.8 µM	0.8±0.1 µM	0.33±0.1µM

Compuesto	IC <sub>50</sub> , Actividad enzimática de PFKFB3, Ensayo ADP Glo™	IC <sub>50</sub> , Actividad enzimática de PFKFB3 en células	IC <sub>50</sub> , Inhibición de la absorción de 2 desoxiglucosa	IC <sub>50</sub> , toxicidad de la línea celular Jurkat (línea celular de leucemia)
 3-(6-metoxi-quinolin-2-il)-1-piridin-4-il-propenona (PFK-138)	431±34 nM	7.4±1.8 μM	2.2±0.3 μM	1.2±0.2 μM
 1-(2-metoxi-piridin-4-il)-3-(6-metoxi-quinolin-2-il)-propenona (PFK-144)	654±94 nM	10.7±0.3 μM	3.1±0.5 μM	1.7±0.3 μM
 3-(6-(2-piperidin-1-iletoxi)-quinolin-2-il)-1-piridin-4-il-propenona (PFK-150)	802±177 nM	15.6±1.4 μM	3.8±0.8 μM	2.5±0.4 μM
 1-Piridin-4-il-3-(8-trifluorometilquinolin-2-il)-propenona (PFK-153)	173±23 nM	6.0±0.6 μM	1.2±0.6 μM	0.9±0.1 μM
 3-(7-Metil-quinolin-2-il)-1-piridin-4-il-propenona (PFK-154)	622±39 nM	11.3±0.6 μM	2.2±0.6 μM	1.3±0.1 μM

Además, el PFK-158 también presenta propiedades farmacocinéticas inesperadas y superiores, cuando se compara con los compuestos ensayados. Como se muestra en la tabla 9, los parámetros farmacocinéticos clave obtenidos en ratones BalbC, tales como T<sub>1/2</sub> (semivida), C<sub>max</sub> (concentración máxima), AUC (área bajo la curva) o Cl (eliminación), muestran que PFK-158 presenta una farmacocinética impredecible y superior en comparación con quinolil-propenonas estructuralmente similares administradas a la misma concentración (dosificación IV). PFK-158 presenta una mayor C<sub>max</sub> y AUC, una semivida más larga y una eliminación más baja en comparación con los compuestos ensayados.



Tabla 9: Comparación de farmacocinética de PFK-158 con compuestos de quinolil-propenona

Compuestos	T <sub>1/2</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	AUC <sub>0-inf</sub> (ng.h/mL)	Cl (mL/min/kg)
 (PFK-158)	10.5	4176	3235	26
 3-(6-metoxi-quinolin-2-il)-1-piridin-4-il-propenona (PFK-138)	0.7	991	541	154
 1-(2-metoxi-piridin-4-il)-3-(6-metoxi-quinolin-2-il)-propenona (PFK-144)	2.8	1504	696	120
 3-(6-(2-piperidin-1-il-etoxi)-quinolin-2-il)-1-piridin-4-il-propenona (PFK-150)	2.5	40	63	1327
 1-Piridin-4-il-3-(8-trifluorometil-quinolin-2-il)-propenona (PFK-153)	3.8	397	225	327
 3-(7-Metil-quinolin-2-il)-1-piridin-4-il-propenona (PFK-154)	6.1	672	1105	75

5 Cuando se toman conjuntamente, los datos *in vitro* y los datos farmacocinéticos *in vivo* muestran que PFK-158 es sorprendentemente superior en comparación con los análogos probados. PFK-158 posee una combinación superior de actividad celular *in vitro* y propiedades farmacocinéticas *in vivo*; análogos cercanos de PFK-158 no poseen el mismo nivel de actividad contra PFKFB3 y células cancerosas en combinación con las propiedades farmacocinéticas excepcionales observadas de PFK-158.

Ejemplo 6

Formulaciones para administración IV

5 El PFK-158 y sus sales se pueden preparar en una formulación basada en Cremophor®. En un ejemplo, se disuelven 10 mg de PFK-158 en 1 ml de solución 1:1 v:v de Cremophor®: alcohol etílico usando agitación vigorosa. Una vez que el compuesto se disuelve eficazmente, la solución se filtra y a continuación se adiciona a solución salina, agua para inyección, lactato Ringer o D5W en una relación 1:9, dando como resultado una solución transparente, libre de partículas, con una concentración de PFK-158 de aproximadamente 1 mg/ml. La composición es químicamente estable durante al menos 6 horas y se puede administrar a mamíferos, incluyendo seres humanos.

Alternativamente, se puede preparar una solución con una sal de PFK-158, tal como la sal de cloruro PFK-158, HCl. Se pueden preparar formulaciones similares con emulsionantes tales como Tween 80® y similares.

10 Se pueden adicionar excipientes adicionales para aumentar la concentración de PFK-158 o PFK-158, HCl. Los excipientes apropiados incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidona y similares.

15 Se puede preparar una emulsión de PFK-158 sobre la base p/p: 1% de PFK-158, 15% de E80 (excipiente basado en lípidos), 5% de aceite de soja, 2% de Polysorbate 80, 10% de sacarosa, 67% de agua, El pH se ajusta a 5.5 y a continuación, la composición se mezcla bien utilizando cualquier mezclador de alta velocidad disponible. La emulsión resultante es estable y se puede administrar de forma segura por vía intravenosa a mamíferos, incluyendo seres humanos. En otra realización, la emulsión comprende 0.5% de PFK-158, 10% de aceite de soja, 5.5% de Miglyol 812, 5% de PL90G, 10% de sacarosa y 69% de agua DI. Los componentes se mezclan y después se emulsionan usando un mezclador de alta velocidad. Muchos excipientes diferentes son apropiados para su uso en la preparación de una emulsión, siempre que se pueda conseguir el tamaño, la estabilidad y la concentración activos necesarios.

20

25 Una solución que contiene una ciclodextrina también se puede usar para administrar PFK-158 y sus sales a pacientes con cáncer. En una realización, se prepara una solución de Captisol® al 30% p/v en agua para inyección; a continuación, se adiciona la cantidad necesaria para conseguir una solución de 5 mg/ml de PFK-158, HCl y la solución se agita hasta que se obtiene la disolución completa y el pH se ajusta a 3.5. Esta solución se puede administrar con seguridad a mamíferos, incluyendo seres humanos. Opcionalmente, la solución puede ser liofilizada. La adición de agua para inyección conduce a una redisolución completa del liofilizado, momento en el que la solución es apropiada para la administración intravenosa a un mamífero.

#### Ejemplo 7

##### IV Parámetros farmacocinéticos en ratas y perros a 40 mg/kg

30 En otro ejemplo, se usó una solución basada en ciclodextrina para investigar el perfil PK de PFK-158, 2HCl a una concentración más alta tanto en ratas como en perros.

35 La solución se preparó con 40% p/v de Captisol® en agua para inyección, 5% de manitol y una solución reguladora de citrato de pH 2.3 que condujo a una concentración de PFK-158, 2HCl de 8 mg/ml. Esta solución se administró IV de forma segura a ratas y perros a una dosis de 40 mg/kg. Se tomaron muestras de sangre durante un periodo de 24 horas y se analizaron. Se calcularon los valores de  $AUC_{0 \rightarrow t}$  de plasma de  $37,600 \pm 2800$  hr.ng/mL y  $27,700 \pm 5800$  hr.ng/mL y se calcularon los valores de  $C_{max}$  en plasma de  $51,400 \pm 6300$  ng/mL y  $39,500 \pm 10,000$  ng/mL para ratas machos y hembras, respectivamente. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon de la misma manera en perros: Se obtuvieron valores de  $AUC_{0 \rightarrow 24}$  de  $16,100 \pm 700$  y  $15,900 \pm 2600$  hr.ng/mL, y se obtuvieron valores de  $C_{5min}$  de  $6960 \pm 1180$  y  $6900 \pm 900$  ng/mL para perros macho y hembra, respectivamente. Los resultados mostraron una alta exposición en ambas especies.

40

#### Ejemplo 8

##### Estudio toxicológico en perros a 40 mg/kg

45 En otro ejemplo, se investigó la toxicidad potencial de PFK-158 (en la forma de su dication) a 40 mg/kg en perros Beagle macho y hembra usando un régimen de dosificación de 3 días a la semana durante un total de tres semanas. Se investigó la toxicidad potencial de PFK-158 mediante el control de todos los signos clínicos durante la fase de vida, tomando muestras de sangre y orina para paneles de química clínica completos y análisis de orina, controlando pesos corporales y consumo de alimentos. La necropsia macroscópica y la histopatología completa se realizaron en el momento de la finalización.

50 Los resultados mostraron que, a la dosis de 40 mg/kg dosificada tres veces por semana durante tres semanas, el PFK-158 fue muy bien tolerado y que no había signos de toxicidad. Esta dosis fue identificada como el NOAEL (nivel de efecto adverso no observable) y corresponde a la dosis equivalente humana (HED) de  $800 \text{ mg/m}^2$ . Como se muestra en el ejemplo 4 anterior, PFK-158 muestra buena actividad en varios modelos de cáncer a dosis IV de 30 mg/kg o una HED de  $90 \text{ mg/m}^2$ . PFK-158 tiene por lo tanto una amplia ventana terapéutica que apoya aún más su desarrollo.

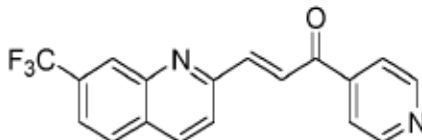
La citación de cualquier documento no debe interpretarse como una admisión de que es un estado de la técnica con respecto a la presente invención.

Aunque se han ilustrado y descrito realizaciones particulares de la presente invención, el alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

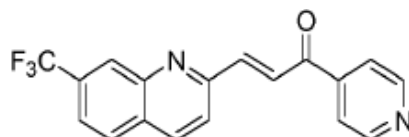
5

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la fórmula:



5 2. Compuesto (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la fórmula:



para uso en el tratamiento de un cáncer.

10 3. El compuesto para uso según la reivindicación 2, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma multiforme, cánceres de piel, cánceres de tejido conectivo, cánceres de adiposo, cánceres de mama, cánceres de pulmón, cánceres de estómago, cánceres de páncreas, cánceres de órganos reproductores y de ovarios, cánceres de cuello uterino, cánceres de útero, cánceres anogenitales, cánceres de riñón, cánceres de vejiga, cánceres de hígado, cánceres colorrectal o de colon y cánceres de tracto digestivo (GI), cánceres de próstata y cánceres de órganos reproductivos, cánceres del sistema nervioso central (SNC), cáncer de retina, cánceres de sangre, y linfoides, y cánceres de cabeza y cuello.

4. Una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer, que comprende:

(a) una cantidad eficaz de (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(b) al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

20 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, que comprende además un segundo agente contra el cáncer.

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que el segundo agente contra el cáncer se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, doxorubicina, vincristina, vinblastina, 5-FU, irinotecano, metotraxato, leucovorina, bevacizumab, cetuximab, sunitinib, imatinib, temozolomida y gemcitabina.

25 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma multiforme, cánceres de piel, cánceres de tejido conectivo, cánceres de adiposo, cánceres de mama, cánceres de pulmón, cánceres de estómago, cánceres de páncreas, cánceres de órganos reproductores y de ovarios, cánceres de cuello uterino, cánceres de útero, cánceres anogenitales, cánceres del riñón, cánceres de vejiga, cánceres de hígado, cánceres colorrectal o de colon y cánceres de tracto digestivo (GI), cánceres de próstata y cánceres de órganos reproductivos, cánceres del sistema nervioso central (SNC), cáncer de la retina, cánceres de sangre, y linfoides, y cánceres de cabeza y cuello.

8. El compuesto para uso según la reivindicación 3, en el que el uso comprende además administrar un segundo agente contra el cáncer.

35 9. El compuesto para uso según la reivindicación 8, en el que el segundo agente contra el cáncer se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, doxorubicina, vincristina, vinblastina, 5-FU, irinotecano, metotraxato, leucovorina, bevacizumab, cetuximab, sunitinib, imatinib, temozolomida y gemcitabina.

10. El compuesto para uso según la reivindicación 9, en el que el segundo agente contra el cáncer se coadministra con (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona.

40 11. Compuesto (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de un tumor.

12. El compuesto para uso en el tratamiento de un tumor según la reivindicación 11, en el que el uso comprende además administrar un segundo agente contra el cáncer.
13. El compuesto para uso según la reivindicación 12, en el que el segundo agente contra el cáncer se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, doxorubicina, vincristina, vinblastina, 5-FU, irinotecano, metotraxato, leucovorina, bevacizumab, cetuximab, sunitinib, imatinib, temozolomida y gemcitabina.
- 5
14. El compuesto para uso según la reivindicación 13, en el que el segundo agente contra el cáncer se coadministra con (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona.
15. Un método *in vitro* para inhibir el flujo glucolítico en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10
16. Método *in vitro* para inhibir la actividad enzimática de PFKFB3 en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de (E)-1-(piridin-4-il)-3-(7-(trifluorometil)quinolin-2-il)-prop-2-en-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

ADP GLO PFK-158

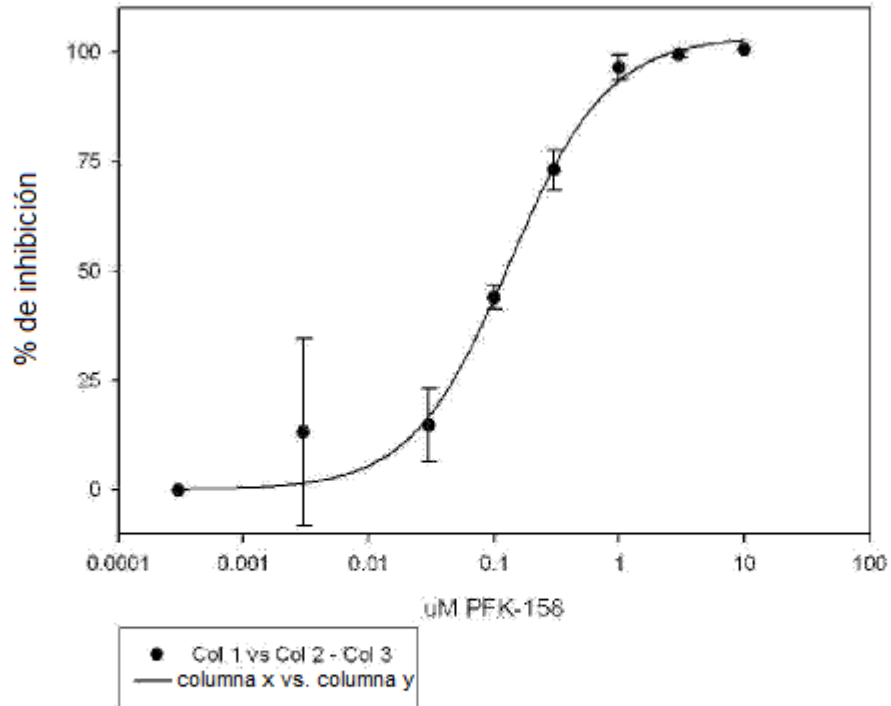


Fig. 1

Absorción de glucosa PFK-158

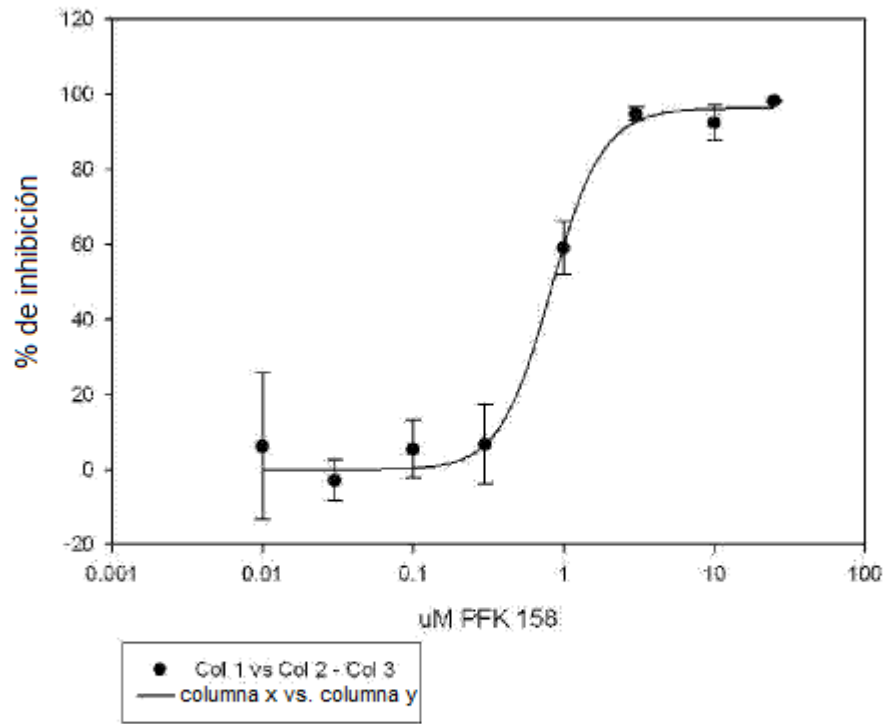


Fig. 2

Inhibición de PFKFB3 F2,6BP en Jurkat

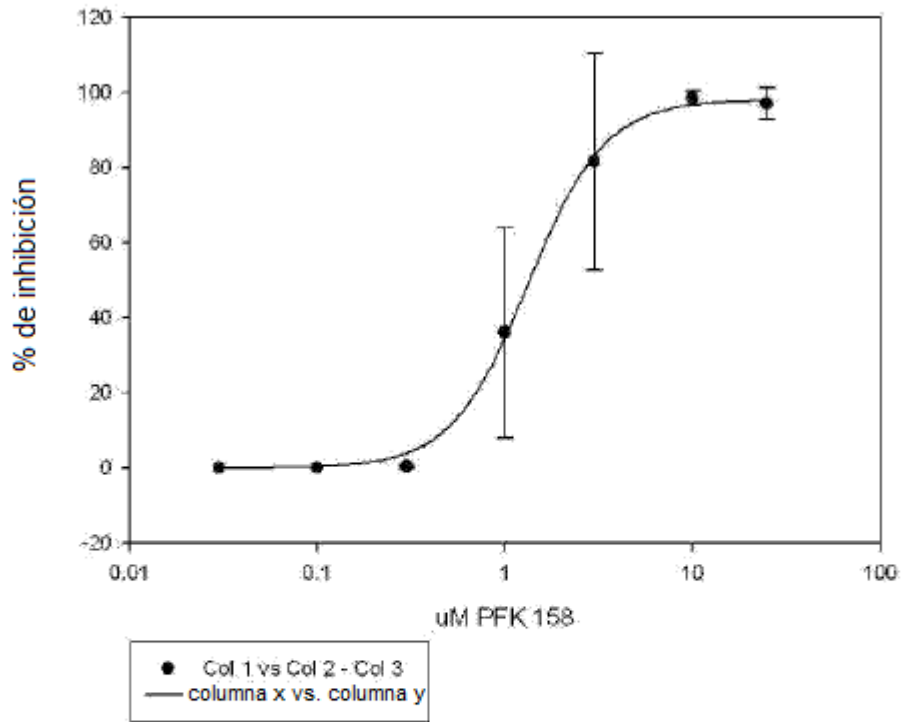


Fig. 3



Tiempo vs. Concentración plasmática de PFK-158 en ratones BalbC  
(dosis IV, 5 mg/kg)

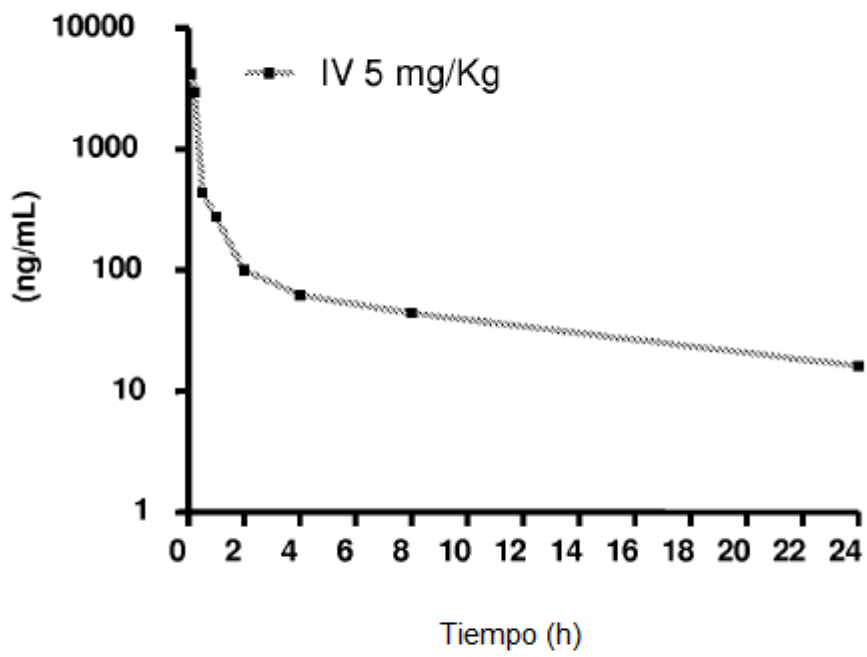


Fig. 4

Tiempo vs. Concentración plasmática de PFK-158 en ratas SD  
(dosis IV, 30 mg/kg)

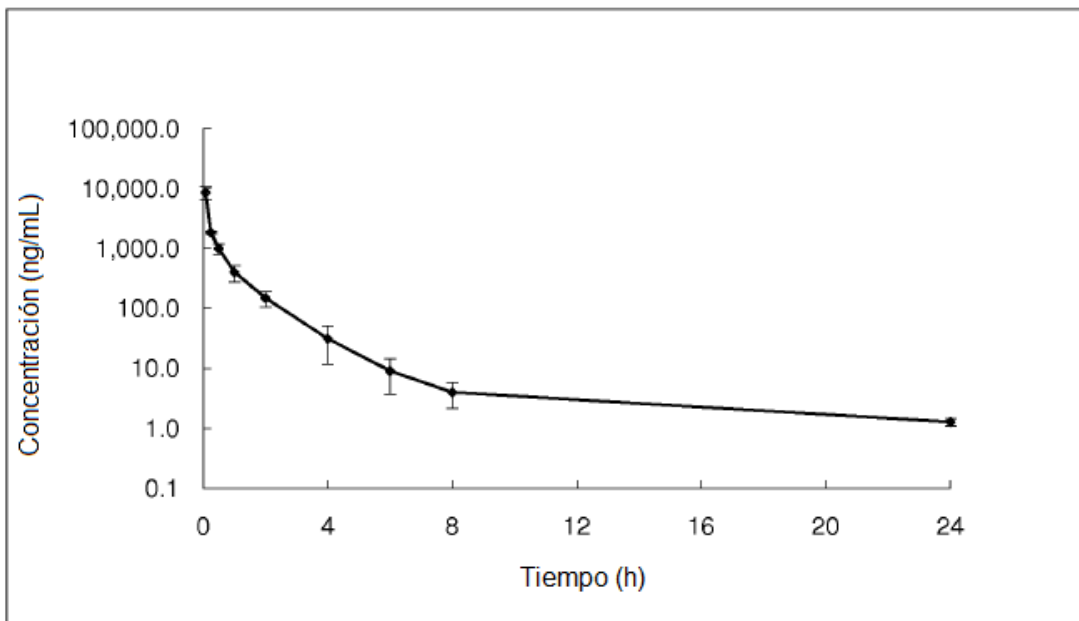


Fig. 5

Modelo de carcinoma de pulmón de Lewis

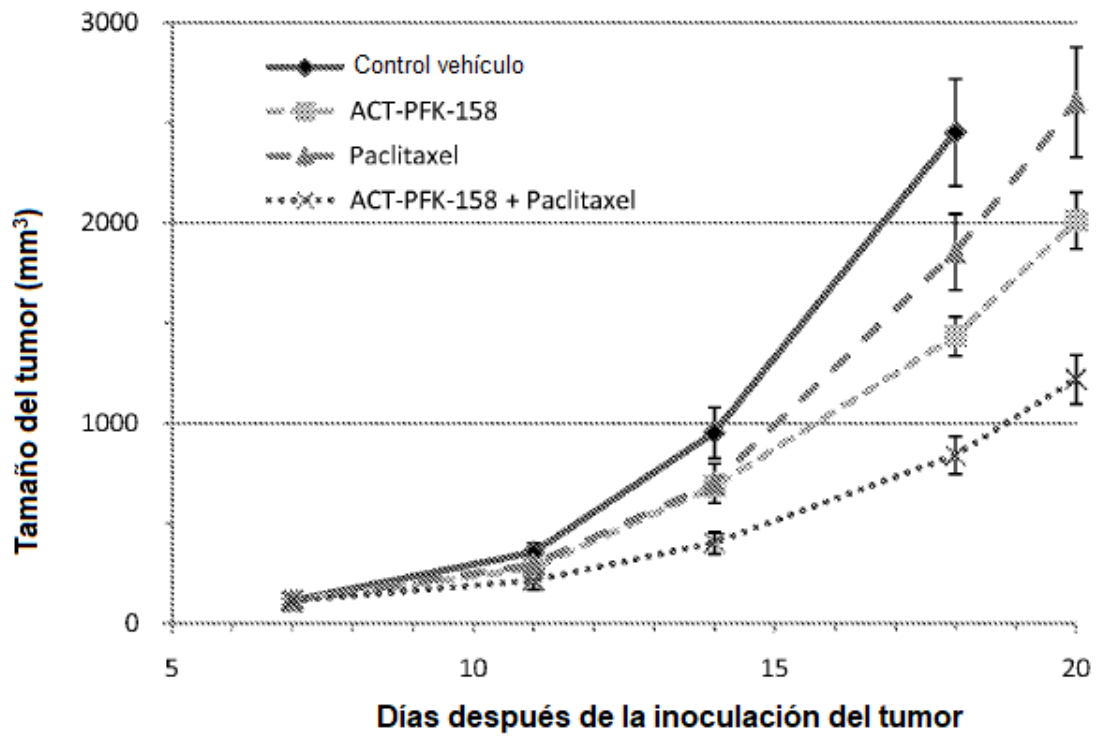


Fig. 6

Modelo de cáncer de colon murino CT-26

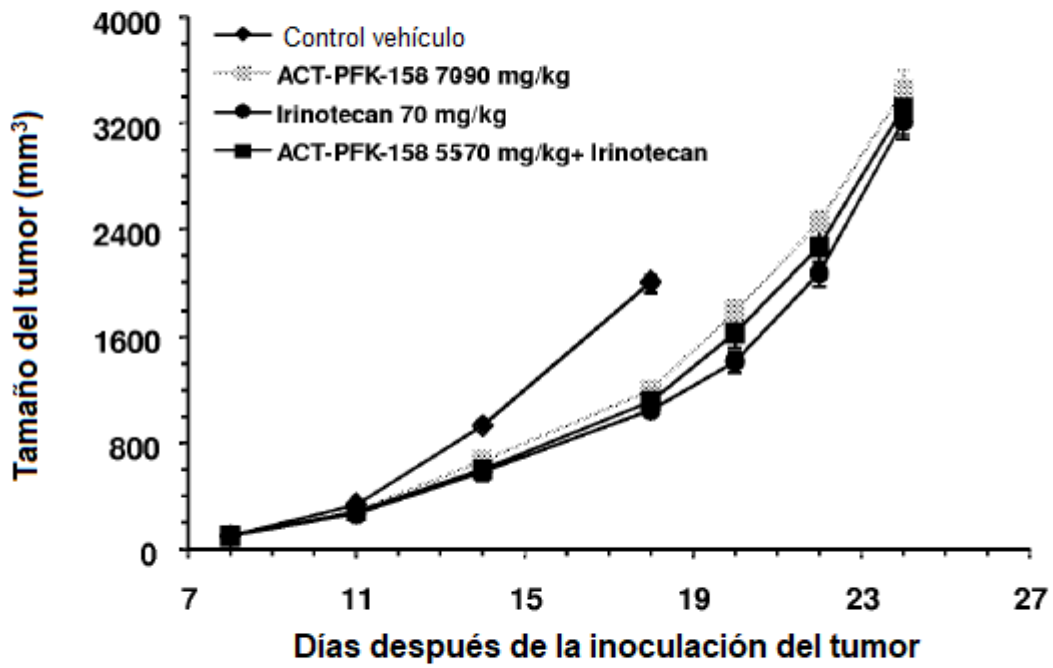


Fig. 7

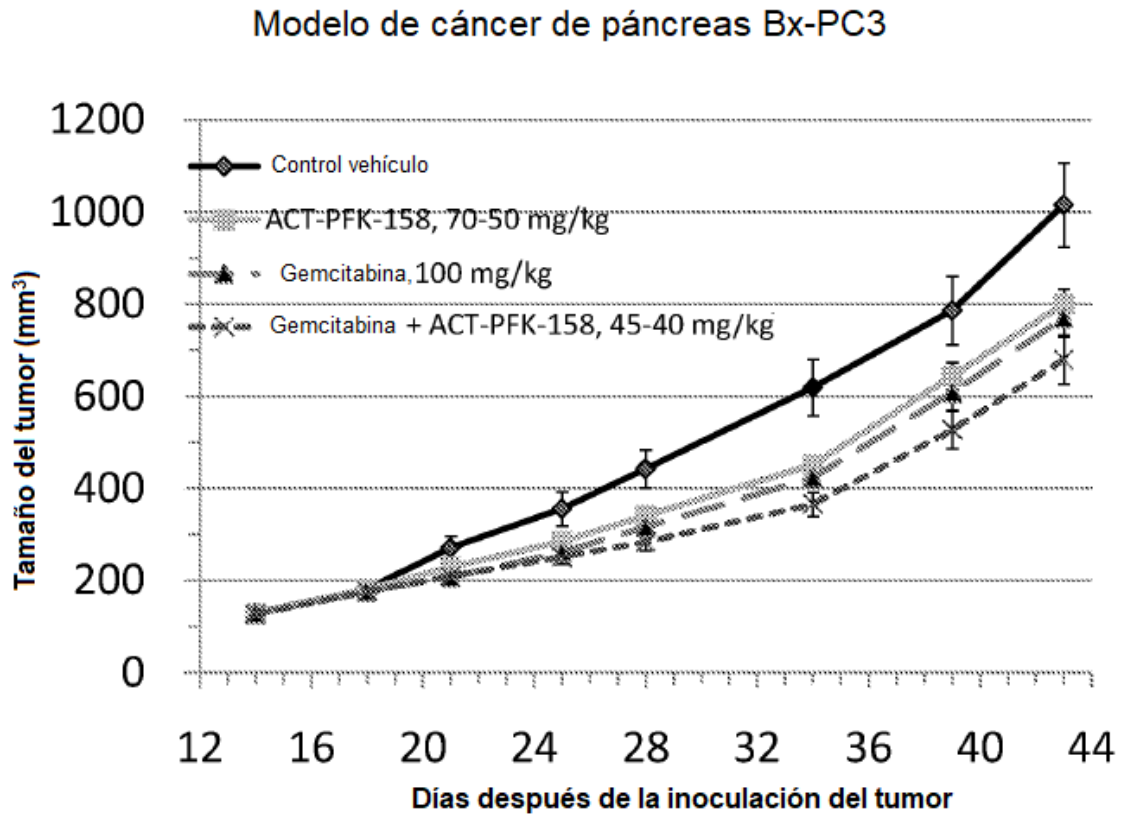


Fig. 8