



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 088**

51 Int. Cl.:
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 31/565 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02735595 .7**
96 Fecha de presentación : **06.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1399221**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2004**

54 Título: **Composiciones que comprenden estrona-3-O-sulfamato y TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionada con TNF).**

30 Prioridad: **07.06.2001 GB 0113920**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.12.2009

73 Titular/es: **Sterix Limited**
190 Bath Road
Slough, Berkshire SL1 3XE, GB

72 Inventor/es: **Packham, Graham Keith;**
Reed, Michael John y
Potter, Barry Victor Lloyd

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 330 088 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

Composiciones que comprenden estrona-3-*O*-sulfamato y TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionada con TNF).

La presente invención se refiere a una composición. En particular, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica y a un uso de la misma.

El cáncer sigue siendo una causa principal de mortalidad en la mayoría de los países occidentales. Hasta la fecha, las pruebas sugieren que los estrógenos son los mitógenos principales implicados en promover el crecimiento de tumores en tejidos endocrino dependientes, tales como la mama y el endometrio. Aunque las concentraciones plasmáticas de estrógenos son similares en mujeres con o sin cáncer de mama, los niveles de estrona y estradiol en el tumor de mama son significativamente mayores que en la sangre o tejido de mama normal. Se piensa que la síntesis *in situ* de estrógeno realiza una importante contribución a los altos niveles de estrógenos en tumores, y por tanto los inhibidores específicos de la biosíntesis de estrógenos son de valor potencial para el tratamiento de tumores endocrino dependientes.

A lo largo de las últimas dos décadas, ha habido un considerable interés en el desarrollo de inhibidores de la ruta de la aromataza que convierte el precursor de andrógenos, la androstenodiona, en estrona. Sin embargo, ahora hay pruebas de que la ruta de la estrona sulfatasa ("E1-STS"), es decir, la hidrólisis de sulfato de estrona ("E1S") en estrona ("E1"), en oposición a la ruta de la aromataza, es la fuente principal de estrógeno en tumores de mama. Esta teoría está apoyada por una modesta reducción de la concentración plasmática de estrógenos en mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama tratadas mediante inhibidores de la aromataza, tales como aminoglutetimida y 4-hidroxiandrostenodiona, y también por el hecho de que la concentración plasmática de E1S en estos pacientes tratados con inhibidor de la aromataza permanece relativamente alta. La larga semivida de E1S en la sangre (10-12 h), en comparación con los estrógenos no conjugados (20 min.), y los altos niveles de actividad de esteroide sulfatasa en el hígado y tejidos de mama malignos y normales también prestan apoyo a esta teoría.

Singh *et al* (1997 J Steroid Biochem Mol Biol 61: 185-192) dan a conocer que la fuente principal de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α e IL-6, dentro de los tumores de mama no es bien comprendida, pero se piensa que los macrófagos y linfocitos infiltrantes en el tumor pueden desempeñar un papel.

Singh *et al* (*ibid*) también dan a conocer que tanto TNF- α como IL-6 inhiben el crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 *in vitro*. Además, el TNF- α presenta un efecto inhibitor sobre la actividad aromataza medida en células de cáncer de mama MCF-7 en cultivo. Aparentemente, estos resultados contrastan con el marcado efecto estimulador que presenta el TNF- α sobre fibroblastos derivados de tejidos de mama malignos y normales (Macdiarmid *et al* 1994 Molec. Cell Endoc. 106: 17-21). Además, cuando se combina TNF- α con IL-6, se potencia el efecto inhibitor sobre la actividad de aromataza. El efecto inhibitor sinérgico de IL-6 y TNF- α sobre la actividad de aromataza en células MCF-7 también contrasta con el efecto estimulador sinérgico que estas citocinas tienen sobre las actividades de estrona sulfatasa y estradiol deshidrogenasa en estas células.

El ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL/Apo-2L) induce apoptosis en un amplio intervalo de células tumorales uniéndose a los receptores TRAIL-R1 (DR4) y TRAIL-R2 (DR5). Estos son miembros de la superfamilia del TNF α de receptores de la muerte, caracterizados por poseer "dominios de muerte" intracelulares, que son responsables de la transducción de la señal de la muerte (Ashkenazi y Dixit 1998).

El tratamiento con TRAIL en combinación con agentes que dañan el ADN, tales como doxorrubicina, etopósido y radiación ionizante, ha demostrado que potencia significativamente las acciones antitumorales de TRAIL en células de cáncer de mama (Keane *et al.*, 1999, Gibson *et al.*, 2000, Chinnalyan *et al.*, 2000). Se piensa que el mecanismo para esta cooperación es debido a la capacidad de los agentes que dañan el ADN para incrementar los niveles de los receptores DR5 y/o DR4, posiblemente mediado a través del aumento del supresor tumoral p53 o del factor de transcripción NF κ B. (Wu *et al.*, 1997, Gibson *et al.*, 2000).

La presente invención busca proporcionar una composición adecuada para su uso en el tratamiento de cánceres y, especialmente, el cáncer de mama.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición como se define en las reivindicaciones que comprende (i) un compuesto que comprende un grupo sulfamato ("compuesto de sulfamato"), y (ii) un inductor de la apoptosis.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición como se define en las reivindicaciones para su uso en medicina.

Según un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un uso de una composición como se define en las reivindicaciones en la preparación de un medicamento para prevenir y/o inhibir el crecimiento tumoral.

Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de una composición como se define en las reivindicaciones en la preparación de un medicamento para tratar cáncer.

5 Según un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de una composición como se define en las reivindicaciones en la preparación de un medicamento para tratar tumores de tejido endocrino dependiente.

La presente invención es ventajosa porque proporciona una composición adecuada para su uso en el tratamiento de cánceres y, especialmente, cánceres de mama.

10 Además, la presente invención es ventajosa porque proporciona un compuesto que es adecuado para su uso en el tratamiento de cánceres, tales como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer del endometrio, sarcomas, melanomas, cáncer de próstata, etc., especialmente cáncer de mama.

15 Otra ventaja de las composiciones de la presente invención es que pueden ser más potentes *in vivo* que los compuestos de sulfamato solos o el inductor de la apoptosis solo. Además, en algunos aspectos, la combinación de compuestos de sulfamato y el inductor de la apoptosis es más potente que lo que se podría esperar a partir de la potencia del compuesto solo, es decir, esta es una relación sinérgica entre ellos.

20 La combinación sinérgica del compuesto de sulfamato y del inductor de la apoptosis permite el uso de menores dosis del compuesto de sulfamato o del inductor de la apoptosis o de ambos. Esto es particularmente ventajoso cuando se han de evitar cantidades terapéuticas requeridas en sistemas no sinérgicos, por ejemplo por razones de toxicidad de uno de los componentes.

25 Se ha encontrado sorprendentemente que los compuestos de sulfamato de la presente invención aumentan la función receptora de un receptor de un ligando inductor de la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRAIL). En un aspecto, mediante la expresión “aumentan la función receptora” se quiere decir que se proporciona un incremento de la señalización vía el receptor. Sin estar atados por la teoría, se cree que los presentes compuestos pueden eliminar o inhibir agentes que de otro modo reducirían o por sí mismos inhibirían el receptor. Se puede afirmar que los compuestos de la invención sensibilizan al receptor de un ligando inductor de la apoptosis relacionada con el
30 factor de necrosis tumoral frente a TRAIL.

Según la presente invención, la composición de la presente invención puede comprender más de un inductor de la apoptosis.

35 Una citocina es una molécula -a menudo una proteína soluble- que permite a las células inmunitarias comunicarse entre sí. Estas moléculas ejercen sus funciones biológicas a través de receptores específicos expresados sobre la superficie de células diana. La unión de los receptores dispara la liberación de una cascada de señales bioquímicas que afectan profundamente el comportamiento de la célula que tiene el receptor (Poole, S 1995 TibTech 13: 81-82). Se han identificado a nivel molecular muchas citocinas y sus receptores (Paul y Sedar 1994, Cell 76: 241-251), y forman
40 moléculas adecuadas de valor terapéutico así como dianas terapéuticas por derecho propio.

En Molecular Biology and Biotechnology (Pub. VCH, Ed. Meyers, 1995, páginas 202, 203, 394, 390, 475, 790) se pueden encontrar muchos detalles sobre citocinas.

45 El inductor de la apoptosis es un ligando inductor de la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRAIL). Aún más preferentemente, el TRAIL es TRAIL/Apo-2L.

50 Con este aspecto de la presente invención, las composiciones de la presente invención son más potentes *in vivo* que los compuestos de sulfamato solos o el TRAIL solo. Además, en algunos aspectos, la combinación de compuestos de sulfamato y TRAIL es más potente que lo que se podría esperar a partir de la potencia del compuesto solo, es decir, esta es una relación sinérgica entre ellos.

El TRAIL se puede preparar químicamente, o se puede extraer de fuentes. Preferentemente, el TRAIL se prepara mediante el uso de técnicas de ADN recombinantes.

55 En un aspecto preferido, el inductor de la apoptosis es capaz de interactuar con un receptor de un ligando inductor de la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRAIL). Preferentemente, el receptor es DR4 y/o DR5.

La presente invención se puede usar para la activación de una caspasa.

60 Mediante el término caspasa se quiere decir típicamente una proteasa de la familia de las caspasas. La expresión “proteasa de la familia de las caspasas” incluye miembros de las caspasa proteasas como se describen en Alnemri, E. *et al.* (1996) Cell 87:171, incluyendo caspasa-1 (ICE), caspasa-2 (ICH-1), caspasa-3 (CPP32, Yama, apopafina), caspasa-4 (TX, ICH-2, ICE.sub.rel -II), caspasa-5 (ICE.sub.rel -III, TY), caspasa-6 (Mch2), caspasa-7 (Mch3, ICE-LAP3, CMH-1), caspasa-8 (MACH, FLICE, Mch5), caspasa-9 (ICE-LAP6, Mch6) y caspasa-10 (Mch4). Adicionalmente, una “proteasa de la familia de las caspasas” incluye cualquier proteína que comparte más de 20% de identidad de secuencia de aminoácidos con ICE en los dominios activos de la proteasa (es decir, dominios activos de las subunidades p10 y p20 de ICE), contiene la secuencia peptídica glutamina-alanina-cisteína-X-glicina (QACXG), en la que la

cisteína (C) es el resto de cisteína catalíticamente activo y X representa cualquier aminoácido, y contiene la secuencia serina-histidina-glicina (SHG), localizada N-terminal con respecto al motivo QACXG, en la que la histidina (H) es el resto de histidina catalíticamente esencial. Las proteasas de la familia de las caspasas demuestran típicamente una fuerte preferencia por la hidrólisis de enlaces peptídicos inmediatamente después de un aminoácido ácido (es decir, ácido aspártico o ácido glutámico).

Las proteasas de la familia de las caspasas son conocidas en seres humanos y otros organismos, incluyendo ratones y *Caenorhabditis elegans*. Los ejemplos de proteasas de la familia de las caspasas incluyen, por ejemplo, Ich-1 (Wang, L *et al.* (1994) *Cell* 78:739-750); ICH-2 (Kamens, J. *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270:15250-15256); Mch2 (Fernandes-Alnemri, T. *et al.* (1995) *Cancer Res.* 55:2737-2742); CPP32 (Fernandes-Alnemri, T. *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:30761-30764); Yama/ CPP32.beta. (Tewari, M. *et al.* (1995) *Cell* 81:801-809); el producto del gen de ratón Nedd2 (Kumar, S. *et al.* (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185:1155-1961; Kumar, S. *et al.* (1994) *Genes Dev.* 8:1613-1626); el producto del gen de *C. elegans*, ced-3 (Yuan, J. *et al.* (1993) *Cell* 75:641-652); la proteína humana TX (Faucheu, C., *et al.*, (1995) *EMBO J.* 14: 1914-1922); ICE.sub.rel II e ICE.sub.rel III (Munday, N. A *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270:15870-15876).

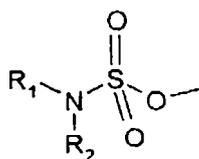
Preferentemente, la caspasa es una caspasa efectora.

Preferentemente, la caspasa es caspasa 3.

Según la presente invención, la composición de la presente invención puede comprender más de un compuesto de sulfamato.

La expresión "compuesto de sulfamato" significa un compuesto que comprende por lo menos un grupo sulfamato.

El grupo sulfamato del compuesto de sulfamato presenta la fórmula:



en la que cada uno de R₁ y R₂ se selecciona independientemente de entre H o un grupo hidrocarbilo.

La expresión "grupo hidrocarbilo" tal como se usa en la presente memoria significa un grupo que comprende por lo menos C y H, y puede comprender opcionalmente uno o más sustituyentes adecuados adicionales. Los ejemplos de tales sustituyentes pueden incluir halógeno, alcoxilo, nitro, un grupo hidrocarbonado, un grupo N-acilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarbilo comprende más de un C, entonces esos carbonos no necesitan estar unidos necesariamente entre sí. Por ejemplo, por lo menos dos de los carbonos se pueden unir mediante un elemento o grupo adecuado. De este modo, el grupo hidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno.

En una forma de realización preferida de la presente invención, el grupo hidrocarbilo es un grupo hidrocarbonado.

En la presente memoria, el término "hidrocarbonado" significa uno cualquiera de entre un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo alquino, un grupo acilo, grupos que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos, o un grupo arilo. El término hidrocarbonado también incluye esos grupos pero que se han sustituido opcionalmente. Si el grupo hidrocarbonado es una estructura ramificada que presenta un sustituyente o sustituyentes sobre la misma, entonces la sustitución puede ser o bien en la cadena principal del grupo hidrocarbonado, o bien en la ramificación; alternativamente, las sustituciones pueden ser en la cadena principal del grupo hidrocarbonado y en la ramificación.

Preferentemente, R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de entre H o alquilo, cicloalquilo, alqueno y arilo, o juntos representan alqueno, en los que el o cada alquilo o cicloalquilo o alqueno contienen opcionalmente uno o más heteroátomos o grupos.

Cuando están sustituidos, los compuestos N-sustituidos de la presente invención pueden contener uno o dos sustituyentes de N-alquilo, N-alqueno, N-cicloalquilo, N-acilo o N-arilo, preferentemente conteniendo o cada uno conteniendo un máximo de 10 átomos de carbono. Cuando R₁ y/o R₂ es alquilo, los valores preferidos son aquellos en los que R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente de grupos alquilo inferiores que contienen desde 1 hasta 5 átomos de carbono, es decir, metilo, etilo, propilo, etc. Preferentemente, R₁ y R₂ son ambos metilo. Cuando R₁ y/o R₂ es arilo, valores típicos son fenilo y toliilo (-PhCH₃; *o*-, *m*- o *p*-). Cuando R₁ y R₂ representan cicloalquilo, valores típicos son ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, etc. Cuando se unen juntos, R₁ y R₂ representan típicamente un grupo alqueno que proporciona una cadena de 4 a 6 átomos de carbono, interrumpida opcionalmente por uno o más

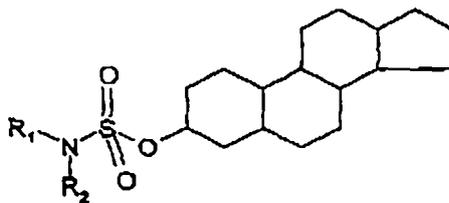
ES 2 330 088 T3

heteroátomos o grupos, por ejemplo -O- o -NH-, para proporcionar un heterociclo de 5, 6 ó 7 miembros, por ejemplo, morfolino, pirrolidino o piperidino.

Dentro de los valores alquilo, cicloalquilo, alqueno, acilo y arilo, se incluyen grupos sustituidos que contienen como sustituyentes en los mismos uno o más grupos que no interfieren con la actividad inhibidora de sulfatasa del compuesto en cuestión. Los sustituyentes ejemplares no interferentes incluyen hidroxilo, amino, halógeno, alcoxilo y arilo. Un ejemplo no limitativo de un grupo hidrocarbilo es un grupo acilo.

En algunas formas de realización preferidas, por lo menos uno de R_1 y R_2 es H.

El compuesto de sulfamato tiene un anillo esteroideo, y tiene la fórmula



en la que cada uno de R_1 y R_2 se selecciona independientemente de entre H o un grupo hidrocarbilo.

En términos generales, el sistema anular puede contener una variedad de sustituyentes que no interfieren. En particular, el sistema anular puede contener uno o más sustituyentes hidroxilo, alquilo, especialmente alquilo inferior (C_1 - C_6), por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo y otros isómeros de pentilo, y n-hexilo y otros isómeros de hexilo, alcoxi, especialmente alcoxi inferior (C_1 - C_6), por ejemplo metoxi, etoxi, propoxi, etc., alquinilo, por ejemplo etinilo, o halógeno, por ejemplo fluoro.

En algunas formas de realización, el compuesto de la invención puede contener más de un grupo sulfamato, tal como por lo menos dos grupos sulfamato. A título de ejemplo, puede haber dos sulfamatos (es decir, compuestos de bis-sulfamato). Si estos compuestos se basan en un núcleo esteroideo, preferentemente el segundo grupo sulfamato (o por lo menos uno de los adicionales) está situado en la posición 17 del núcleo esteroideo. El más de un grupo sulfamato no necesita ser el mismo.

El compuesto de sulfamato es un compuesto de sulfamato esteroideo (oxi)hidrocarbílico en el que el grupo sulfamato está en la posición 3 en el componente esteroideo, y/o el grupo (oxi)hidrocarbílico está en la posición 2 en el componente esteroideo.

En una forma de realización, preferentemente, el compuesto de sulfamato es un derivado de oxihidrocarbilo de sulfamato de estrona.

En una forma de realización, preferentemente, el compuesto de sulfamato es un derivado de oxihidrocarbilo de 3-O-sulfamato de estrona.

En una forma de realización, preferentemente, el compuesto de sulfamato es un derivado de alcoxi o alquilo C_{1-6} (tal como un C_{1-3}) de 3-O-sulfamato de estrona.

En una forma de realización, preferentemente, el compuesto de sulfamato es un derivado de 2-alcoxi o alquilo C_{1-6} (tal como un C_{1-3}) de estrona-3-O-sulfamato.

La expresión "grupo oxihidrocarbilo", como se utiliza en la presente memoria, significa un grupo que comprende por lo menos C, H y O, y puede comprender opcionalmente uno o más sustituyentes adecuados adicionales. Los ejemplos de tales sustituyentes pueden incluir halógeno, alcoxilo, nitro, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo oxihidrocarbilo comprende más de un C, entonces esos carbonos no necesitan estar unidos necesariamente entre sí. Por ejemplo, por lo menos dos de los carbonos se pueden unir mediante un elemento o grupo adecuado. Por tanto, el grupo oxihidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo, azufre y nitrógeno.

En una forma de realización preferida de la presente invención, el grupo oxihidrocarbilo es un grupo oxihidrocarbonado.

En la presente memoria, el término "oxihidrocarbonado" significa uno cualquiera de un grupo alcoxilo, un grupo oxialqueno, un grupo oxialquino, grupos los cuales pueden ser lineales, ramificados o cíclicos, o un grupo oxiarilo. El término oxihidrocarbonado también incluye aquellos grupos pero que se han sustituido opcionalmen-

ES 2 330 088 T3

te. Si el grupo oxihidrocarbonado es una estructura ramificada que presenta un sustituyente o sustituyentes sobre la misma, entonces la sustitución puede ser o bien en la cadena principal del grupo hidrocarbonado o bien en la ramificación; alternativamente, las sustituciones pueden ser en la cadena principal del grupo hidrocarbonado y en la ramificación.

5

Preferentemente, el grupo (oxi)hidrocarbilo es un alcoxi/alquilo. El grupo alquilo (del sustituyente alcoxi) es preferentemente un grupo alquilo inferior que contiene de 1 a 5 átomos de carbono, es decir, metilo, etilo, propilo, etc. Preferentemente, el grupo alquilo es metilo o etilo.

10 En una forma de realización, preferentemente, el grupo oxihidrocarbilo es un grupo de la fórmula $C_{1-6}O$ (tal como un $C_{1-3}O$), más preferentemente un grupo metoxi.

Más preferentemente, el grupo $C_{1-6}O$ está unido a la posición 2 del anillo A de un núcleo esteroideo.

15 En una forma de realización altamente preferida, el compuesto de sulfamato es 3-*O*-sulfamato de 2-metoxiestrona.

En una forma de realización, preferentemente, el grupo hidrocarbilo es un grupo de la fórmula C_{1-6} , más preferentemente un grupo etilo.

20 En una forma de realización altamente preferida, el compuesto de sulfamato es 3-*O*-sulfamato de 2-etilestrona.

Si el compuesto de sulfamato comprende un núcleo esteroideo, preferentemente el anillo A tiene un grupo (oxi)hidrocarbilo en la posición 2.

25 Preferentemente el compuesto de sulfamato comprende por lo menos un grupo sulfanilhidrocarbilo. Mediante el término sulfanilhidrocarbilo se quiere decir un grupo de la fórmula -L-S-R, en la que L es un grupo enlazante opcional, S representa azufre, y R es un grupo hidrocarbilo (como se define en la presente memoria).

30 En una forma de realización preferida, el grupo sulfanilhidrocarbilo y el grupo sulfamato están unidos cada uno al mismo anillo en las posiciones *orto* uno con respecto al otro.

35 Un compuesto de sulfamato preferido es un compuesto de sulfamato esteroideo sulfanilhidrocarbílico (es decir, un compuesto de sulfamato que comprende un componente esteroideo y un grupo sulfanilhidrocarbilo). En este aspecto, preferentemente, el grupo sulfanilhidrocarbilo y el grupo sulfamato están unidos cada uno al anillo A de la estructura/componente esteroideo.

40 Con respecto a formas de realización esteroideas de la invención, preferentemente, el grupo sulfanilhidrocarbilo está unido a la posición 2 del anillo A de la estructura esteroidea, y/o el grupo sulfamato está unido a la posición 3 del anillo A de la estructura esteroidea. En una realización, preferentemente, el compuesto de sulfamato es un compuesto de sulfamato esteroideo sulfanilhidrocarbílico en el que el grupo sulfamato está en la posición 3 en el componente esteroideo, y/o el grupo sulfanilhidrocarbilo está en la posición 2 en el componente esteroideo.

45 En una forma de realización, preferentemente, el compuesto de sulfamato es un derivado sulfanilhidrocarbílico de sulfamato de estrona.

En una forma de realización, preferentemente, el compuesto de sulfamato es un derivado sulfanilhidrocarbílico de 3-*O*-sulfamato de estrona.

50 En una forma de realización, preferentemente, el compuesto de sulfamato es un derivado alquil C_{1-6} (tal como un C_{1-3})-sulfanílico de 3-*O*-sulfamato de estrona.

En una forma de realización, preferentemente, el compuesto de sulfamato es un derivado 2-alquil C_{1-6} (tal como un C_{1-3})-sulfanílico de 3-*O*-sulfamato de estrona.

55 En una forma de realización preferida de la presente invención, el grupo sulfanilhidrocarbilo es un grupo sulfanilhidrocarbonado.

Mediante el término "sulfanilhidrocarbonado" se quiere decir un grupo de la fórmula -L-S-R en la que L es un grupo enlazante opcional, S representa azufre, y R es un grupo hidrocarbonado (como se define en la presente memoria).

60

En una forma de realización, preferentemente, el grupo sulfanilhidrocarbilo es un grupo de la fórmula $C_{1-6}S$ (tal como un $C_{1-3}S$), más preferentemente un grupo CH_3S o CH_3CH_2S .

Más preferentemente, el grupo $C_{1-6}S$ está unido a la posición 2 del anillo A de un núcleo esteroideo.

65

En una forma de realización altamente preferida, el compuesto de sulfamato es 3-*O*-sulfamato de 2-metilsulfanilestrona o 3-*O*-sulfamato de 2-etilsulfanilestrona.

ES 2 330 088 T3

Preferentemente, si el grupo sulfamato en el compuesto de sulfamato se sustituyese por un grupo sulfato para formar un compuesto de sulfato, entonces el compuesto de sulfato sería hidrolizable mediante una enzima esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2).

5 Preferentemente, si el grupo sulfamato en el compuesto de sulfamato se sustituyese por un grupo sulfato para formar un compuesto de sulfato, y el compuesto de sulfato se incubase con una enzima esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2) a un pH de 7,4 y 37°C, proporcionaría un valor de K_m menor que 50 mM.

10 Preferentemente, si el grupo sulfamato en el compuesto de sulfamato se sustituyese por un grupo sulfato para formar un compuesto de sulfato, y el compuesto de sulfato se incubase con una enzima esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2) a un pH de 7,4 y 37°C, proporcionaría un valor de K_m menor que 50 μ M.

15 Preferentemente, el compuesto de sulfamato es adecuado para su uso como inhibidor de la estrona sulfatasa (E.C. 3.1.6.2).

En una forma de realización preferida de la presente invención, preferentemente, el compuesto de sulfamato no es estrogénico. La expresión "no estrogénico" significa que no muestra o sustancialmente no muestra actividad estrogénica.

20 En una forma de realización preferida de la presente invención, preferentemente, el compuesto esteroideo no puede metabolizarse en compuestos que presentan o inducen actividad hormonal.

En una forma de realización preferida de la presente invención, preferentemente, la composición de la presente invención es activa por vía oral.

25 La presente invención se basa en el hallazgo sumamente sorprendente de que la combinación de un compuesto de sulfamato y un inductor de la apoptosis proporciona un tratamiento eficaz del cáncer.

30 Más particularmente, se ha encontrado sorprendentemente que la composición de la presente invención puede inducir la apoptosis.

La apoptosis es inducida por fármacos que se dirigen a los microtúbulos, un proceso que puede implicar la fosforilación (e inactivación) del regulador de la apoptosis, la proteína bcl-2 (Halder, Cancer Res. 57: 229, 1997).

35 Preferentemente, la composición de la presente invención comprende además un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Para la administración farmacéutica, la composición de la presente invención se puede formular de cualquier manera adecuada, usando técnicas de formulación farmacéutica convencionales y vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, etc. farmacéuticos (tales como aquellos para administración parenteral). Las tasas de dosis eficaces aproximadas están en el intervalo de 100 a 800 mg/día, dependiendo de las actividades individuales de los compuestos en cuestión y para un paciente de peso corporal medio (70 Kg). Tasas de dosificación más habituales para las composiciones preferidas y más activas estarán en el intervalo de 200 a 800 mg/día, más preferentemente de 200 a 500 mg/día, lo más preferible de 200 a 250 mg/día. Se pueden administrar en regímenes de dosis única, regímenes de dosis dividida y/o en regímenes de dosis múltiple que duran a lo largo de varios días. Para la administración oral, se pueden formular en comprimidos, cápsulas, disolución o suspensión, que contienen de 100 a 500 mg de composición por dosis unitaria. Alternativa y preferentemente, las composiciones se formularán para administración parenteral en un vehículo adecuado administrable por vía parenteral y que proporciona tasas de dosificación diaria única en el intervalo de 10 a 800 mg, 10 a 500 mg, 200 a 800 mg, preferentemente 200 a 500, más preferentemente 200 a 250 mg. Sin embargo, tales dosis diarias eficaces variarán dependiendo de la actividad inherente del principio activo y del peso corporal del paciente, estando tales variaciones dentro de la pericia y juicio del médico.

40 La composición o compuesto de la presente invención se puede administrar de cualquier manera adecuada (tal como una cualquiera o más de administración oral, administración tópica (tal como por medio de un parche), administración parenteral, administración rectal o mediante pulverizador de inhalación).

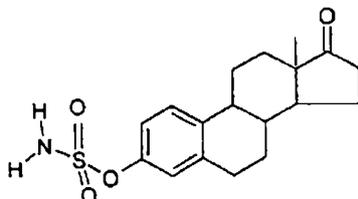
55 Para aplicaciones particulares, se prevé que las composiciones de la presente invención se puedan usar en terapias de combinación, bien con otro inhibidor de sulfatasa o bien, por ejemplo, en combinación con un inhibidor de aromataasa, tal como, por ejemplo, 4-hidroxiandrostenediona (4-OHA).

60 Según la presente invención, los componentes de la composición se pueden añadir en mezcla, simultánea o secuencialmente. Además, según la presente invención, puede ser posible formar por lo menos una parte de la composición *in situ* (tal como *in vivo*) induciendo la expresión de (o aumentando la expresión de) uno de los componentes. Por ejemplo, puede ser posible inducir la expresión del (o aumentar la expresión del) inductor de la apoptosis, tal como TNF. A título de ejemplo, puede ser posible inducir la expresión de (o aumentar la expresión de) TNF añadiendo lipopolisacárido (LPS) bacteriano y dipéptido de muramilo (MDP). A este respecto el LPS bacteriano y MDP, en combinación, pueden estimular la producción de TNF a partir de células de bazo murinas *in vitro* y la regresión tumoral *in vivo* (Fuks *et al* Biull Eksp Biol Med 1987 104: 497-499).

ES 2 330 088 T3

El documento PCT/GB92/01587 presenta nuevos inhibidores de esteroide sulfatasa y composiciones farmacéuticas que los contienen para su uso en el tratamiento de tumores dependientes de estrona, especialmente cáncer de mama. Estos inhibidores de esteroide sulfatasa son ésteres de sulfamato. Ejemplos de tales inhibidores son derivados de éster de sulfamato de esteroides.

Un compuesto adecuado para su uso en la presente invención (que también es un compuesto preferido del documento PCT/GB92/01587) es 3-sulfamato de estrona (conocido de otro modo como "EMATE"), que tiene la siguiente estructura:



Se sabe que EMATE es un potente inhibidor de E1-STS dado que muestra más del 99% de inhibición de la actividad de E1-STS en células MCF-7 intactas a $0,1 \mu\text{M}$. EMATE también inhibe la enzima E1-STS de una manera dependiente de la concentración y del tiempo, indicando que actúa como inactivador dirigido al sitio activo.

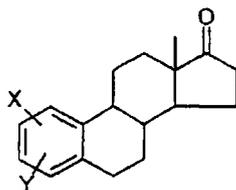
El anillo A tiene un sustituyente en la posición 2, que es un grupo (oxi)hidrocarbilo.

Según un aspecto preferido de la presente invención, si el grupo sulfamato del compuesto se sustituyese por un grupo sulfato para formar un compuesto de sulfato, entonces ese compuesto de sulfato sería hidrolizable mediante una enzima que tiene actividad de esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2), es decir, cuando se incubaba con esteroide sulfatasa EC 3.1.6.2 a pH 7,4 y 37°C .

En una forma de realización preferida, si el grupo sulfamato del compuesto se sustituyese por un grupo sulfato para formar un compuesto de sulfato, entonces ese compuesto de sulfato sería hidrolizable mediante una enzima que tiene actividad de esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2), y produciría un valor de K_m menor que 50 mM cuando se incubaba con esteroide sulfatasa EC 3.1.6.2 a pH 7,4 y 37°C .

En otra forma de realización preferida, si el grupo sulfamato del compuesto se sustituyese por un grupo sulfato para formar un compuesto de sulfato, entonces ese compuesto de sulfato sería hidrolizable mediante una enzima que tiene actividad de esteroide sulfatasa (E.C. 3.1.6.2), y produciría un valor de K_m menor que $50 \mu\text{M}$ cuando se incubaba con esteroide sulfatasa EC 3.1.6.2 a pH 7,4 y 37°C .

Un compuesto de sulfamato preferido de la presente invención tiene la fórmula:



en la que X es un grupo (oxi)hidrocarbilo en la posición 2; e Y es un grupo sulfamato en la posición 3; y en la que los anillos A, B, C y D están opcionalmente sustituidos de manera independiente.

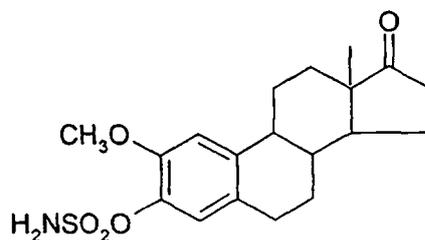
Para la presente invención, preferentemente, el compuesto de sulfamato es un compuesto de sulfamato esteroideo oxihidrocarbílico, en particular 3-O-sulfamato de 2-metoxiestrona, 3-O-sulfamato de 2-etilestrona, o 3-O,17-bis-sulfamato de 2-metoxiestrona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo sus análogos.

El 3-O-sulfamato de 2-metoxiestrona es un análogo de EMATE, y se puede denominar 2-metoxi EMATE (2-MeOEMATE). El 3-O-sulfamato de 2-etilestrona es un análogo de EMATE, y se puede denominar 2-metil EMATE (2-EtEMATE). El 3-O,17-bis-sulfamato de 2-metoxiestrona es un análogo de EMATE, y se puede denominar MeOE2bisMATE. 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE se describen con detalle en los documentos WO 99/64013 y WO 00/66095, respectivamente. 2-MeOE2bisMATE se describe con detalle en el documento WO 02/16392 (PCT/GB01/03688).

ES 2 330 088 T3

El 2-metoxi EMATE tiene la formula presentada como fórmula a continuación:

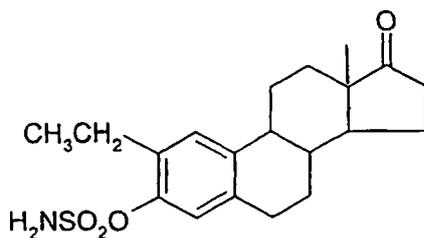
5



10

El 2-etil EMATE tiene la formula presentada como fórmula a continuación:

15

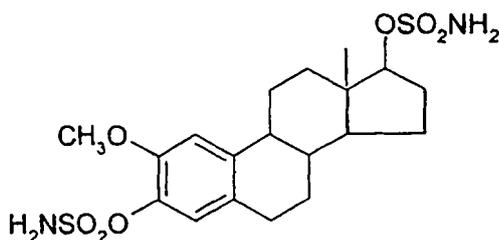


20

25

El 2-MeOE2bisMATE tiene la formula presentada como fórmula a continuación:

30



35

40

45

50

Los compuestos de sulfamato de la presente invención se pueden preparar haciendo reaccionar un alcohol apropiado con el cloruro de sulfamoilo apropiado, $R_1R_2NSO_2Cl$. Las condiciones preferidas para llevar a cabo la reacción son las siguientes. Se añaden hidruro de sodio y un cloruro de sulfamoilo a una disolución agitada del alcohol en dimetilformamida anhidra a $0^\circ C$. Posteriormente, la reacción se deja calentar hasta temperatura ambiente, tras lo cual la agitación se continúa durante 24 horas adicionales. La mezcla de reacción se vierte sobre una disolución saturada fría de bicarbonato de sodio, y la fase acuosa resultante se extrae con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secan sobre $MgSO_4$ anhidro. La filtración, seguida de la evaporación del disolvente *a vacío* y la coevaporación con tolueno, produce un residuo bruto que se purifica adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida. Preferentemente, el alcohol se derivatiza, según sea apropiado, antes de la reacción con el cloruro de sulfamoilo. Cuando sea necesario, los grupos funcionales en el alcohol se pueden proteger de manera conocida, y el grupo o grupos protectores se pueden eliminar al final de la reacción.

55

En resumen, la presente invención proporciona composiciones para su uso en el tratamiento de tumores y composiciones farmacéuticas que las contienen.

La presente invención se describirá a continuación únicamente a título ejemplificativo, en la que se hará referencia a las siguientes figuras.

60

La Figura 1A muestra una gráfica del efecto de 2-MeOEMATE sobre la apoptosis inducida por TRAIL en células CAL51;

la Figura 1B muestra una gráfica del efecto de 2-EtEMATE sobre la apoptosis inducida por TRAIL en células CAL51;

65

la Figura 1C muestra una gráfica del efecto de 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE sobre la apoptosis inducida por TRAIL en células MCF-7 a las 24 horas;

ES 2 330 088 T3

la Figura 2 muestra una gráfica del efecto de 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE sobre los niveles de ARNm de DR4 y DR5 en células Cal51.

Figura 3. Efecto de 2-MeOE2bisMATE sobre la activación de caspasa 8 y caspasa 3 y escisión de PARP en células Cal51. Las transferencias Western muestran fragmentos no procesados y activos de caspasa 8 y caspasa 3 y productos no escindidos y escindidos de PARP tras el tratamiento de células Cal51 con disolvente, 0,05, 0,5 ó 5 μM de 2-MeOE2bisMATE durante 48 horas.

Figura 4. Efecto del inhibidor de caspasa ZVAD-fmk sobre la apoptosis inducida por 2-MeOE2bisMATE en células Cal51. El ensayo de TUNEL muestra el % de apoptosis de células no tratadas o después del tratamiento con 50 μM de ZVAD-fmk, 5 μM de 2-MeOE2bisMATE o 5 μM de 2-MeOE2bisMATE y 50 μM de zVAD-fmk durante 3 días. Los histogramas son superposiciones para células del control teñidas en ausencia de la enzima TdT (en negrita) o células teñidas con la mezcla de la reacción de TUNEL (en blanco).

Figura 5. Efecto de 2-MeOE2bisMATE sobre el momento de la activación de caspasa 3 y caspasa 8 y la escisión de PARP en células Cal51. Las transferencias Western muestran productos no procesados y escindidos de caspasa 3, caspasa 8 y PARP a 0, 8, 16, 24 y 48 h después del tratamiento de las células Cal51 con 5 μM de 2-MeOE2bisMATE durante 48 h, o no tratadas durante 48 h (48NT).

Figura 6. Efecto de 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE sobre los niveles de la proteína de DR5 en células Cal51. La transferencia Western muestra niveles de proteína de DR5 después del tratamiento de las células Cal51 durante 48 horas con 0, 0,05, 0,5 y 5 μM de 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE. Los niveles de PCNA representan controles de carga correspondientes.

Figura 7. Efecto del tratamiento combinado de 2-EtEMATE o 2-MeOEMATE y TRAIL sobre la activación de caspasa 3 en células Cal51. Las transferencias Western muestran la activación de caspasa 3 después del tratamiento de células Cal51 durante 48 horas con disolvente, 250 ng/ml de TRAIL y 5 μM de 2-EtEMATE o 2-MeOEMATE en presencia o ausencia de 250 ng/ml de TRAIL. Los niveles de PCNA representan controles de carga correspondientes. 1, control; 2, disolvente THF; 3, TRAIL; 4, 2-EtEMATE; 5, 2-EtEMATE + TRAIL; 6, control; 7, disolvente THF; 8, TRAIL; 9, 2-MeOEMATE; 10, 2-MeOEMATE + TRAIL.

La Figura 8 muestra un modelo para la muerte celular inducida por 2-MeOE2bisMATE. La apoptosis inducida por 2-MeOE2bisMATE parece depender principalmente de rutas mediadas por mitocondrias, activadas por microtúbulos dañados en lugar de por receptores de la muerte. Sin embargo, estas rutas pueden cooperar para potenciar la muerte celular vía la activación de caspasa 3.

Las Figuras 1A a 1C muestran los efectos de 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE sobre la apoptosis inducida por TRAIL en células CAL51 y MCF-7. Se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular en los que se cultivaron células CAL51 o células MCF-7 a una densidad de 5.000 en placas de 96 pocillos y se trataron con 0, 0,05, 0,5 ó 5 μM de MeOEMATE o 2-EtEMATE en presencia de 0, 50 ó 250 ng/ml de TRAIL humano recombinante. Los resultados son la media de triplicados \pm S.D., y se expresan como un porcentaje de resultados para células no tratadas.

La Figura 2 muestra el efecto de 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE sobre los niveles de ARNm de DR4 y DR5 en células Cal51. El ensayo de protección de ARNasa muestra niveles de ARNm de DR5, DR4 y GAPDH a 0, 8, 16, 24 y 48 horas después del tratamiento con 0,5 μM de 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE en células Cal51. La gráfica muestra la cuantificación de datos a partir del análisis de fosfoimágenes de bandas de DR5 normalizadas mediante expresión como relación de DR5/GAPDH.

50 Ejemplos

2-MeOEMATE y 2-EtEMATE se sintetizaron según las enseñanzas de los documentos WO 99/64013 y WO 00/66095, respectivamente.

55 Ejemplo 1

Se investigó si 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE cooperarían con TRAIL para inducir apoptosis en células de cáncer de mama. En las Figuras 1A a 1C se muestran los datos obtenidos.

60 Procedimiento

La proliferación celular se midió usando un ensayo de proliferación celular con Cell Titre 96 Aqueous One Solution (Promega). Este es un método colorimétrico que determina la viabilidad celular y por lo tanto se puede usar para medir la capacidad de los fármacos para provocar la muerte celular. El ensayo se lleva a cabo añadiendo directamente a las células el reactivo de proliferación celular. Las células metabólicamente activas convierten el reactivo en un producto de formazano coloreado, y la absorbancia a 490 nm se mide 1-4 h después de la incubación a 37°C.

ES 2 330 088 T3

Para los experimentos de cooperación con TRAIL, se cultivaron células CAL-51 o MCF-7 a 5.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Las células CAL-51 se trataron con 0, 0,05, 0,5 ó 5 μ M de 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE en presencia de 0, 50 ó 250 ng/ml de TRAIL humano recombinante. Las células MCF7 se trataron con 5 μ M de 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE en presencia o ausencia de 250 ng/ml de TRAIL humano recombinante. La proliferación celular se midió 2 días (CAL-51) o 1 día (MCF-7) después de la adición de los fármacos. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, y los datos son medias de resultados por triplicado +/- S.D., y se expresan como un porcentaje de resultados obtenidos para células no tratadas. Los experimentos en células CAL-51 se llevaron a cabo 4 veces para cada compuesto, y una vez para cada compuesto en células MCF-7.

10 *Resultados*

El tratamiento con 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE solo indujo hasta 60% de muerte celular en células CAL51 a lo largo de 2 días. Cuando se trataron con TRAIL solo, las células CAL51 fueron resistentes a la muerte celular inducida por TRAIL. Sin embargo, el tratamiento con 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE en combinación con TRAIL en células CAL51 potenció la cantidad de muerte celular, en comparación con el tratamiento con 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE solo. El tratamiento de las células MCF-7 con 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE solo durante 24 h indujo 13% y 16% de muerte celular. El tratamiento con TRAIL solo indujo 12% de muerte celular. Sin embargo, el tratamiento con 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE en combinación con TRAIL potenció la cantidad de muerte celular, en comparación con el tratamiento con los compuestos solos (35% y 36%). Por lo tanto, los derivados sulfamoidados sensibilizaron a las células CAL51 y MCF-7 frente a la apoptosis inducida por TRAIL.

2-MeOEMATE y 2-EtEMATE potencian la apoptosis inducida por TRAIL en células Cal51 y MCF-7.

25 *Ejemplo 2*

Se investigó si la cooperación observada entre TRAIL y 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE para inducir la muerte celular en células CAL51 fue debida al aumento de receptores DR4 y/o DR5 mediante 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE. Se usaron ensayos de protección de ARNasa para examinar los niveles de ARNm para DR4 y DR5 después del tratamiento de células CAL51 con 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE durante 48 horas. En la Figura 2 se muestran los datos obtenidos.

Procedimiento

Este experimento se llevó a cabo una vez. Se sintetizó una multisonda de ARN radiomarcada (conjunto hAPO-3c de molde de multisonda para la apoptosis humana Pharmingen Ribo-Quant) usando [α^{32} P]UTP y T7 ARN polimerasa. Este conjunto de molde para multisonda permite la generación simultánea de varias sondas para la detección y medida de genes relacionados con la apoptosis. Este conjunto también incluye sondas para los genes de mantenimiento de tareas, L32 y GAPDH, lo que permite la normalización de los errores de toma de muestras y de técnica para permitir la comparación de los niveles de ARNm entre muestras.

El ARN total se preparó usando el reactivo Trizol (Gibco-BRL) a partir de células CAL-51 tratadas con 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE durante 0, 8, 16, 24 y 48 h. La multisonda radiomarcada se hibridó a los ARN toda la noche. El ARN no hibridado se digirió con ARNasa, y los fragmentos hibridados (protegidos) se separaron en un gel de acrilamida al 6%. El gel se secó y se analizó mediante formación de fosfoimágenes en el Personal Molecular Imager Fx (Biorad). Las bandas de los fragmentos protegidos, que corresponden a DR5 y GAPDH, se cuantificaron y se expresaron como una relación de DR5/GAPDH para normalizar los resultados.

Resultados

Los niveles de ARNm de DR5 aumentaron significativamente entre 24 y 48 horas después del tratamiento con ambos fármacos, en comparación con el control no tratado. Por el contrario, los niveles de ARNm de DR4 fueron bajos, en comparación con los niveles de DR5, y no cambiaron significativamente durante este período de tiempo.

2-MeOEMATE y 2-EtEMATE aumentan los niveles de ARNm del receptor DR5 en células CAL-51.

60 *Ejemplo 3*

2-MeOE2bisMATE se sintetizó según las enseñanzas del documento WO 02/16392 (PCT/GB01/03688).

Los Ejemplos anteriores demuestran que 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE superó la resistencia a la apoptosis inducida por TRAIL. Existe un considerable interés en el potencial terapéutico de TRAIL, y se concluyó que estos compuestos pueden ser agentes eficaces para potenciar la apoptosis inducida por TRAIL en terapias contra el cáncer de mama. Se continuó analizando los mecanismos moleculares de la muerte celular inducida por 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE, y se amplió el intervalo de compuestos estudiados para incluir 2-MeOE2bisMATE. Se centró la atención sobre el papel de las caspasas, proteasas de secuencias específicas que desempeñan una función clave en la apoptosis,

y las interacciones con las rutas de los receptores de la muerte. Aunque se ha centrado la atención en los resultados obtenidos usando 2-MeOE2bisMATE, se obtuvieron resultados similares con otros estrógenos sulfamoidados.

5 Ejemplo 3.1

2-MeOE2bisMATE activa caspasa 8 y caspasa 3 e induce la escisión de PARP

10 Las caspasas desempeñan un papel central en la ejecución de la apoptosis escindiendo proteínas celulares (por ejemplo PARP), dando como resultado muchos de los cambios característicos que se producen cuando las células sufren la apoptosis. Hay más de una docena de caspasas, y algunas están asociadas con rutas específicas de muerte celular. Por ejemplo, la activación de caspasa 8 está asociada con la muerte celular inducida vía receptores de la muerte (por ejemplo receptores para TRAIL y Fas), mientras que la caspasa 3 es un mediador central de la muerte celular, común a muchas rutas.

15 Para determinar si las caspasas pueden desempeñar un papel en la muerte celular inducida por 2-MeOE2bisMATE y otros derivados de estrógeno sulfamoidados, se examinó la expresión de caspasa 3, caspasa 8 y PARP mediante inmunotransferencia (Figura 3). Las caspasas son expresadas como una proforma inactiva, y su activación se puede medir mediante la conversión en la enzima activa. El tratamiento de células de cáncer de mama Cal51 con 2-MeOE2bisMATE indujo una activación, dependiente de la dosis, de caspasa 8 y caspasa 3. La escisión de PARP confirmó la activación de caspasas en estas células. Por lo tanto, la muerte celular inducida por el 2-MeOE2bisMATE en células Cal51 está asociada con la activación de caspasas.

25 Ejemplo 3.2

La apoptosis inducida por 2-MeOE2bisMATE es reducida por la inhibición de caspasas

30 Para determinar si la activación de caspasas fue importante para la muerte celular, se ensayó si un inhibidor químico de caspasas de amplio intervalo interfirió con la apoptosis. Las células se trataron con 2-MeOE2bisMATE en presencia y ausencia del inhibidor de caspasas ZVAD-fmk, y se analizó la muerte celular usando el ensayo de TUNEL, el cual mide la escisión de ADN asociada con apoptosis. La inducción de células positivas a TUNEL mediante 2-MeOE2bisMATE se redujo en 60% en presencia de zVAD-fmk (Figura 4). Por lo tanto, 2-MeOE2bisMATE requiere la activación de caspasas para la inducción óptima de la apoptosis.

35 Ejemplo 3.3

La activación de caspasa 3/escisión de PARP inducida por 2-MeOE2bisMATE se produce antes de la activación de caspasa 8

40 Existen dos rutas principales de apoptosis: los receptores de la muerte de la superficie celular activan caspasas directamente vía la activación de caspasa 8, mientras que otros estímulos apoptóticos funcionan disparando la liberación de citocromo c desde mitocondrias, que subsiguientemente activa caspasas. Ambas rutas dan como resultado finalmente la activación de caspasa 3 y la escisión de PARP. Puesto que la activación de caspasa 8 es un indicador para la implicación directa de receptores de la muerte, es importante determinar si la activación de caspasa 8 por 2-MeOE2bisMATE precede o sigue a la activación de caspasa 3. Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos de transcurso de tiempo en células Cal51 tratadas con 2-MeOE2bisMATE, para ordenar los sucesos de la activación. La activación de caspasa 3 se detectó en primer lugar a las 16 horas y, como se esperaba, fue seguido de la escisión de PARP a las 24 horas (Figura 5). La activación de caspasa 8 fue un suceso relativamente tardío, detectado por primera vez a las 48 horas. Por lo tanto, la activación de caspasa 3 inducida por 2-MeOE2bisMATE precede a la activación de caspasa 8.

55 Ejemplo 3.4

2-MeOEMATE, 2-EtEMATE y 2-MeOE2bisMATE no aumentan los niveles de proteína de DR5 mediante transferencia Western en células Cal51

60 Se demostró previamente que los derivados de estrona sulfamoidados aumentan ARNm de DR5 en células Cal51, proporcionando un mecanismo potencial de su acción cooperativa. Sin embargo, fue importante determinar si este cambio en el ARN también estaba asociado con incrementos en la proteína de DR5. Se prepararon lisados proteínicos a partir de células CAL51 tratadas con diversos compuestos, y se analizaron para determinar la expresión de DR5 mediante inmunotransferencia (Figura 6). En contraste con los resultados obtenidos del análisis de ARN, no se detectó ningún incremento significativo en los niveles de la proteína de DR5 mediante transferencia Western tras el tratamiento de células Cal51 durante 48 horas con concentraciones crecientes de 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE. Tampoco se observó ningún cambio significativo en los niveles proteínicos de DR5 después del tratamiento con 2-MeOE2bisMATE durante 48 h (no mostrado).

Ejemplo 3.5

La activación de caspasa 3 inducida por 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE es potenciada adicionalmente mediante cotratamiento con TRAIL

5 Para explorar adicionalmente el mecanismo para la cooperación entre estronas sulfamoidadas y TRAIL, se analizó la activación de caspasa 3 (Figura 7). El tratamiento de células Cal51 durante 48 horas con 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE indujo la activación de caspasa 3 según se detectó mediante la reducción en los niveles de caspasa 3 no procesada mediante transferencia Western. Las células Cal51 son resistentes al tratamiento de la apoptosis inducida por TRAIL, y no hubo ninguna activación detectable de caspasa 3 cuando las células se trataron con TRAIL solo. Sin embargo, cuando las células se trataron con TRAIL en combinación con 2-MeOEMATE o 2-EtEMATE, la activación de caspasa 3 se potenció adicionalmente en comparación con el tratamiento con cualquiera de los compuestos solos. Por lo tanto, las estronas sulfamoidadas y TRAIL cooperan para activar caspasa 3.

15 **Sumario**

Se ha demostrado que cuando se usan en combinación con inductores de la apoptosis tales como TRAIL, los compuestos de sulfamato tales como 2-MeOEMATE y 2-EtEMATE incrementan la sensibilidad de las células de cáncer de mama a inductores de la apoptosis. El mecanismo para esta sensibilidad incrementada puede implicar el aumento de la función receptora, por ejemplo la función receptora de ARNm de DR5, inducido por los derivados sulfamoidados.

Se ha hecho un considerable progreso en la comprensión de los mecanismos moleculares de la muerte celular inducida por los presentes compuestos. Estos estudios proporcionan información valiosa sobre cómo los compuestos tales como 2-MeOE2bisEMATE ejercen sus efectos sobre las células, mecanismos potenciales de resistencia y guía para identificaciones futuras. Los datos apoyan un modelo mediante el cual los sucesos mitocondriales desempeñan un papel destacado en la muerte celular. Se ha mostrado que la caspasa 3 es activada antes que la caspasa 8, y que la inhibición de caspasas interfiere con la muerte celular. Aunque no se ha apuntado a la naturaleza de los sucesos que se producen en las mitocondrias, que conducen a la activación de caspasa 3, ésta puede implicar sucesos que ya se ha demostrado que están asociados con las acciones de los derivados sulfamoidados, tales como cambios en las actividades de miembros de la familia de BCL-2 que están localizados sobre la membrana mitocondrial (por ejemplo fosforilación de BCL-2 y BCL-XL) (MacCarthy-Morrogh *et al* 2000), o la generación de especies oxigenadas reactivas (ROS), que pueden conducir a daño mitocondrial y liberación de citocromo c (Wood *et al* 2002). La activación “tardía” de caspasa 8 se produce probablemente más abajo de caspasa 3, y representa probablemente la amplificación de la señal apoptótica como resultado de la interferencia entre las rutas y puede estar mediada por caspasa 6, que también se sabe que es activada por caspasa 3 y se ha informado que escinde caspasa 8 (Slee *et al* 1999).

Aunque la interferencia con los receptores de la muerte de TRAIL y Fas no evita la apoptosis inducida por 2-MeOE2bisMATE, es posible la combinación con agentes estimulantes de receptores de la muerte, para potenciar la muerte celular. El efecto sinérgico de 2-MeOE2bisMATE y TRAIL está asociado con el aumento de activación de caspasa 3. En lugar de un incremento de la expresión del receptor, el mecanismo molecular parece que implica la sensibilización a la señalización del receptor, por ejemplo mediante inhibición de una molécula inhibidora de la señalización.

La apoptosis inducida por 2-MeOE2bisMATE parece depender principalmente de rutas mediadas por mitocondrias y activadas por microtúbulos dañados en lugar de por receptores de la muerte. Sin embargo, estas rutas pueden cooperar para potenciar la muerte celular vía la activación de caspasa 3.

De este modo, en resumen, la presente invención proporciona una composición y un compuesto adecuados para su uso en el tratamiento de cánceres y, especialmente, cáncer de mama.

En particular, en un aspecto, la presente invención aborda el problema de bloquear el crecimiento de tumores en tejidos endocrino dependientes (por ejemplo mama, endometrio, próstata). No obstante, otros tumores (por ejemplo sarcomas, melanomas) también deberían de ser susceptibles al tratamiento con la composición y el compuesto de la presente invención.

También se cree que la presente invención tiene implicaciones en el tratamiento de afecciones hormonales, además de las asociadas con estrógeno. Por tanto, la presente invención también proporciona una composición que puede afectar a la actividad hormonal y que puede afectar a una respuesta inmunitaria, en la que la composición es la composición de la presente invención.

También debe observarse que la composición de la presente invención puede tener otras implicaciones médicas importantes.

Diversas modificaciones y variaciones de los métodos descritos y del sistema de la invención serán manifiestas para los expertos en la materia sin separarse del alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con formas de realización preferidas específicas, se debería entender que la invención tal como se reivindica no se debería limitar excesivamente a tales formas de realización específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones

ES 2 330 088 T3

de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son obvias para los expertos en la química y campos relacionados, estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Referencias

5

Ashkenazi A y Dixit VM 1998 *Science* 281: 1305-1308

Chinnaiyan AM et al., 2000 *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1754-1759

10

Gibson SB et al., 2000 *Mol Cell Biol* 20: 205-12

Huang P et al., 2000 *Nature* 407 390-395

15

Keane MM et al., 1999 *Cancer Res* 59: 734-41

MacCarthy-Morrogh et al., 2000 *Cancer Res* 60: 5441-50

20

Wu GS et al., 1997 *Nat Genet* 17: 141-143

25

30

35

40

45

50

55

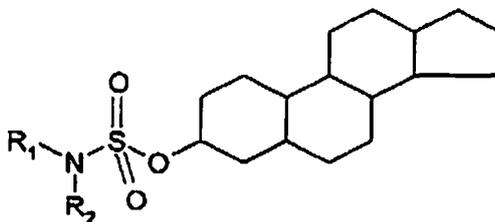
60

65

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende

- 5 i) un compuesto de sulfamato que tiene la fórmula



20 en la que cada uno de R_1 y R_2 se selecciona independientemente de entre H o un grupo hidrocarbilo; en la que el compuesto de sulfamato está sustituido con un grupo hidrocarbilo o un grupo oxihidrocarbilo, y en la que dicho grupo (oxi)hidrocarbilo está unido a la posición 2 del anillo A de la estructura esteroidea; y

- 25 ii) un inductor de la apoptosis, en la que el inductor de la apoptosis es un ligando inductor de la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRAIL).

2. Composición según la reivindicación 1, en la que el TRAIL es TRAIL/Apo-2L.

30 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el inductor de la apoptosis es capaz de interactuar con un receptor del ligando inductor de la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRAIL).

35 4. Composición según la reivindicación 3, en la que el receptor es DR4 y/o DR5.

5. Composición según la reivindicación 1, en la que el grupo oxihidrocarbilo es un grupo de la fórmula $C_{1-6}O$.

35 6. Composición según la reivindicación 5, en la que el grupo $C_{1-6}O$ es un grupo metoxi.

7. Composición según la reivindicación 1, en la que el compuesto de sulfamato es 3-O-sulfamato de 2-metoxiestrona.

40 8. Composición según la reivindicación 1, en la que el grupo hidrocarbilo es un grupo de la fórmula C_{1-6} .

9. Composición según la reivindicación 8, en la que el grupo C_{1-6} es un grupo etilo.

45 10. Composición según la reivindicación 1, en la que el compuesto de sulfamato es 3-O-sulfamato de 2-etilestrona.

11. Composición según la reivindicación 1, en la que el compuesto de sulfamato es 3-O,17-bis-sulfamato de 2-metoxiestrona.

50 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende además un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en medicina.

55 14. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

15. Uso según la reivindicación 14, en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer endometrial, sarcoma, o melanoma.

60 16. Uso según la reivindicación 15, en el que el cáncer es cáncer de mama.

17. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores de tejido endocrino dependiente.

65 18. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la preparación de un medicamento para prevenir y/o inhibir el crecimiento tumoral.

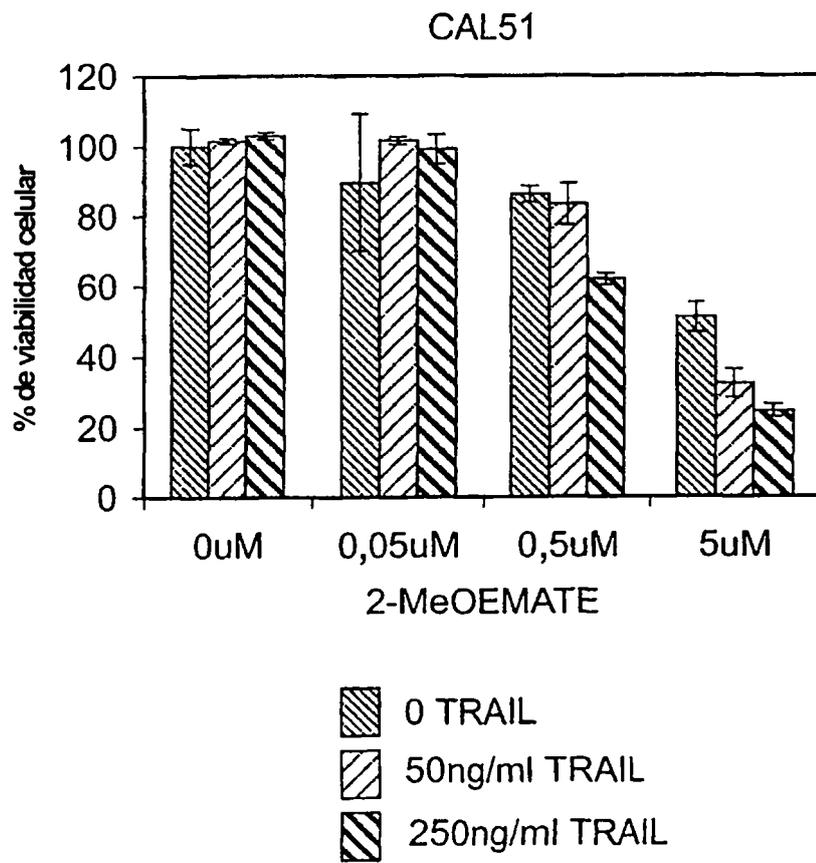


Fig. 1A

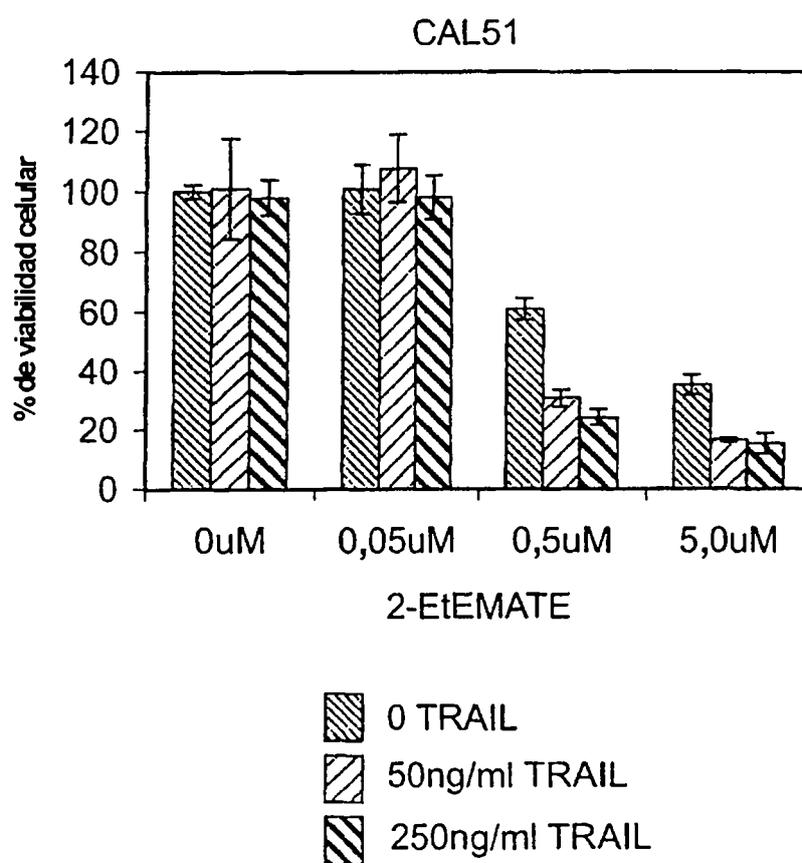


Fig. 1B

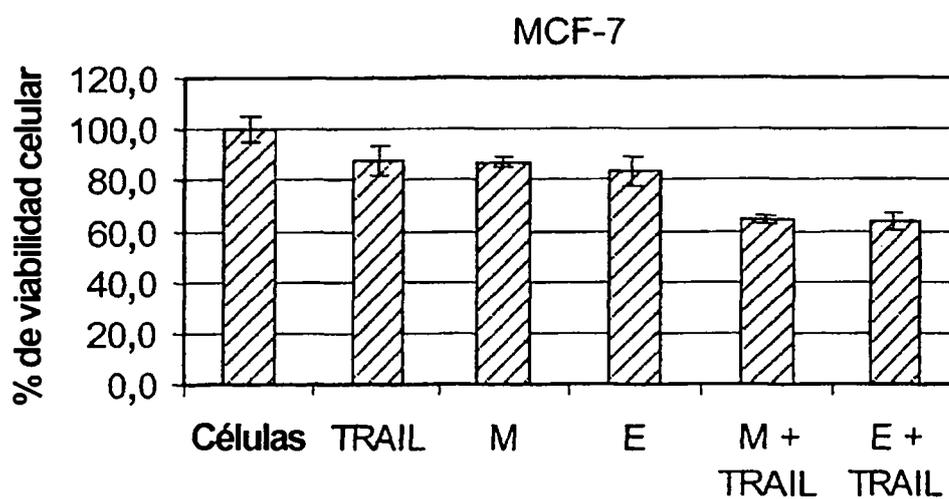


Fig. 1C

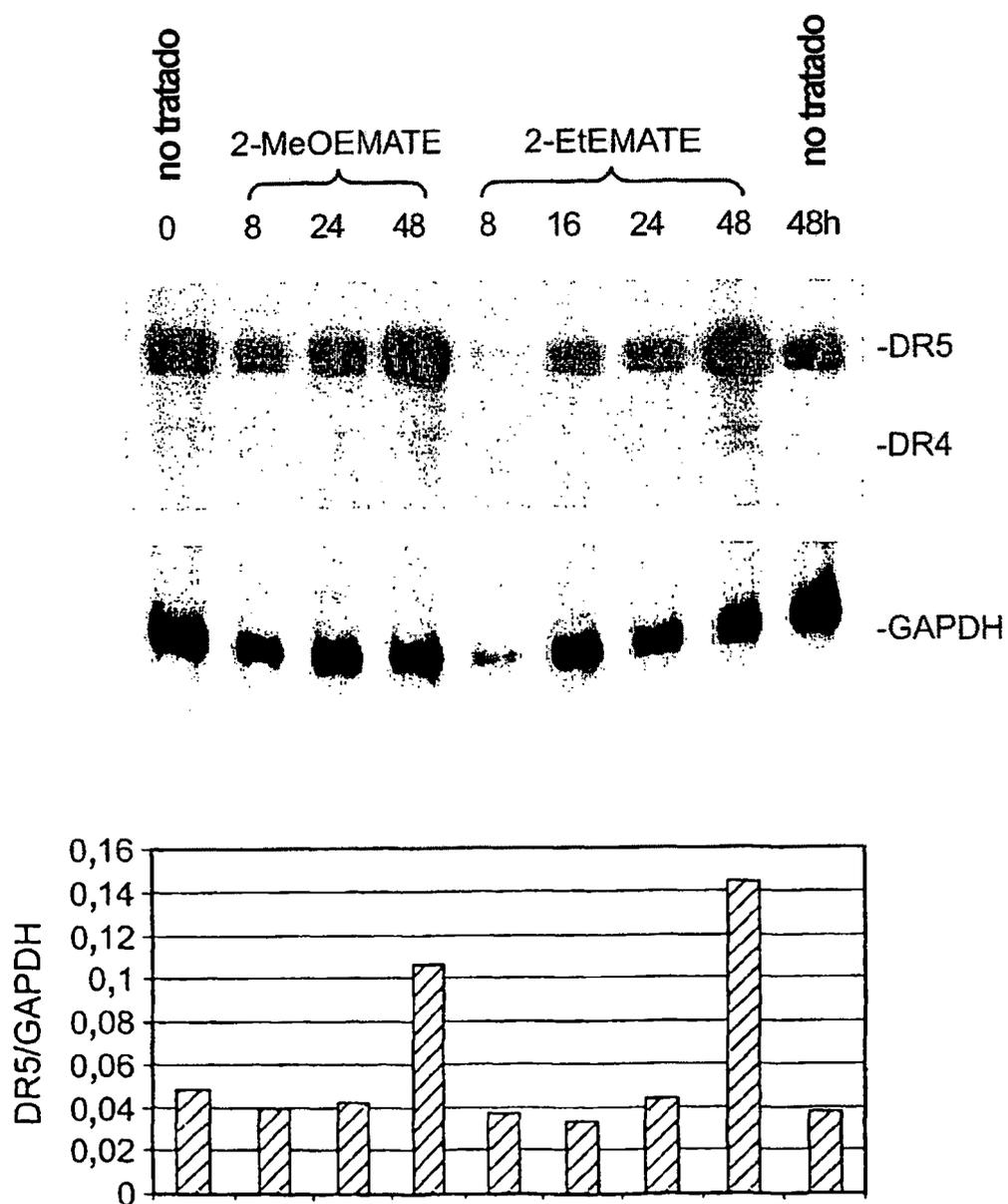


Fig. 2

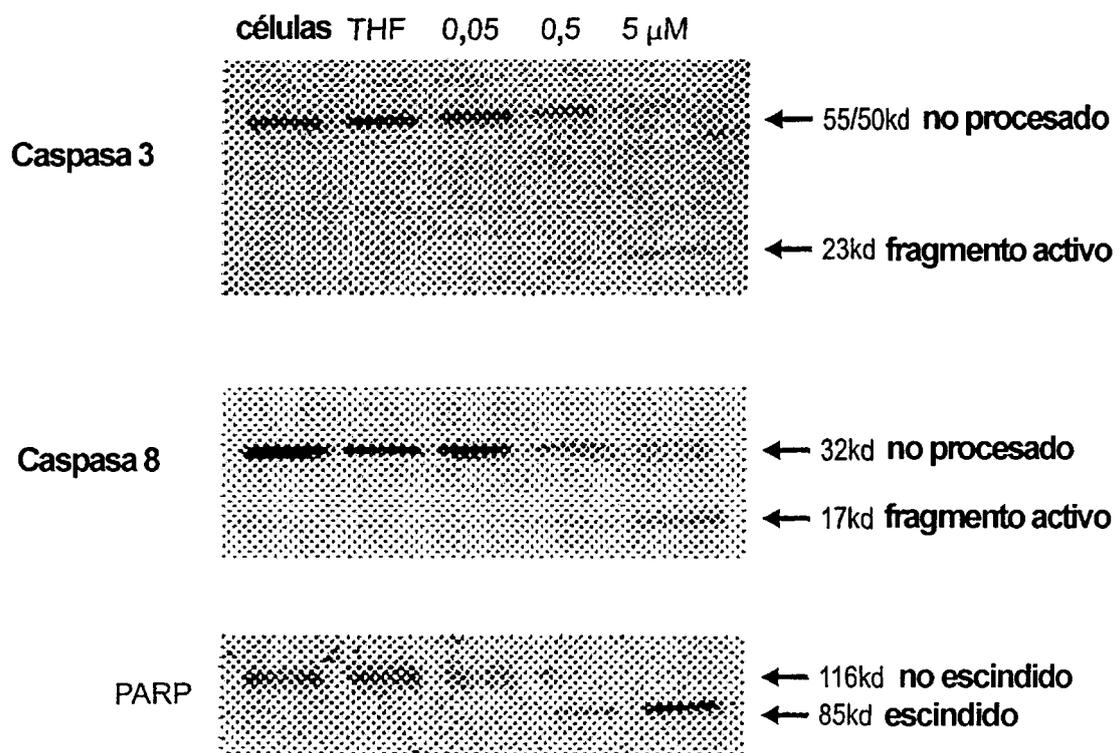


Fig. 3

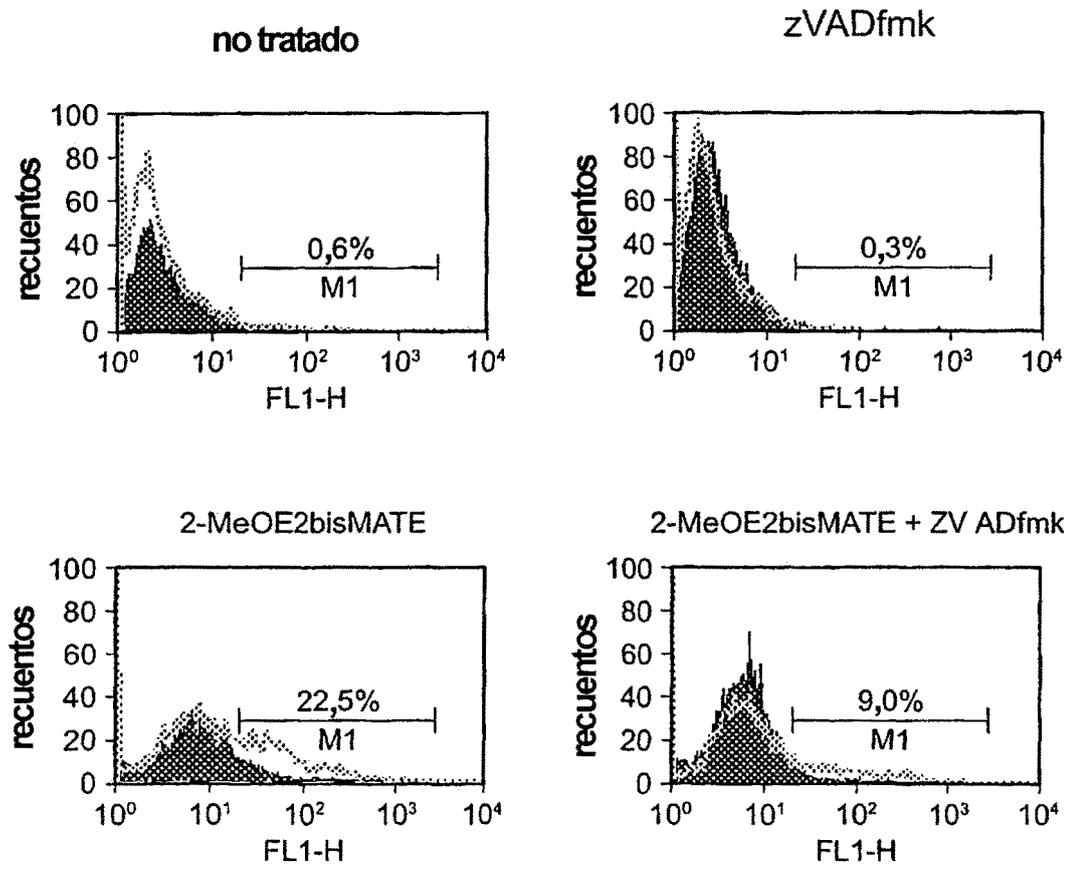


Fig. 4

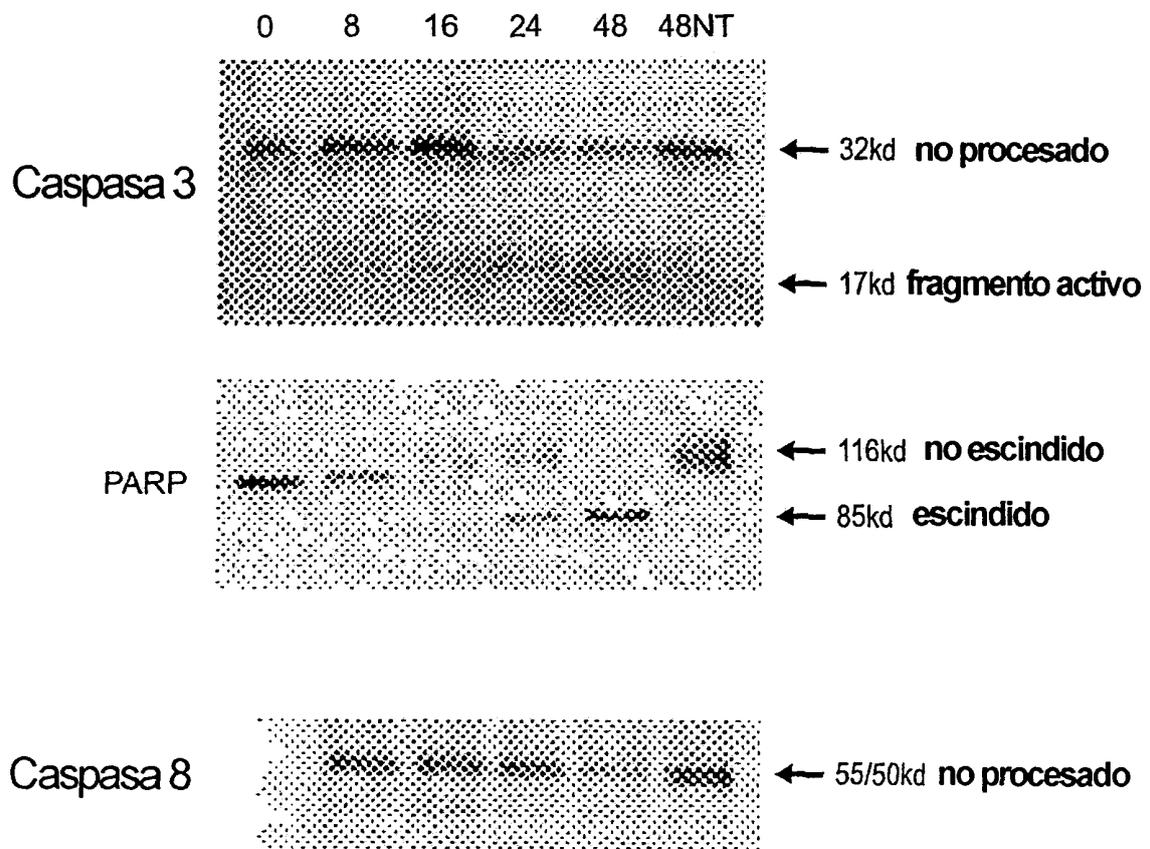


Fig. 5

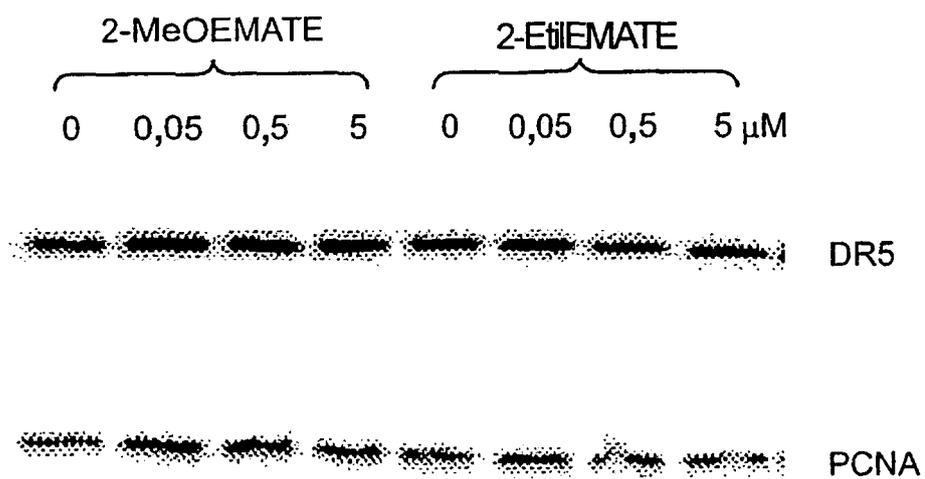


Fig. 6

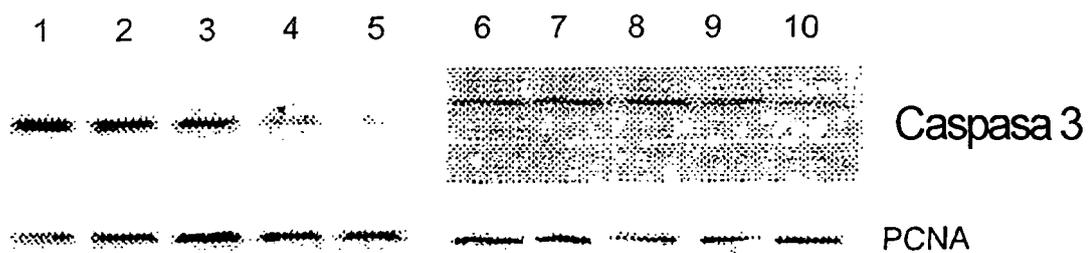


Fig. 7

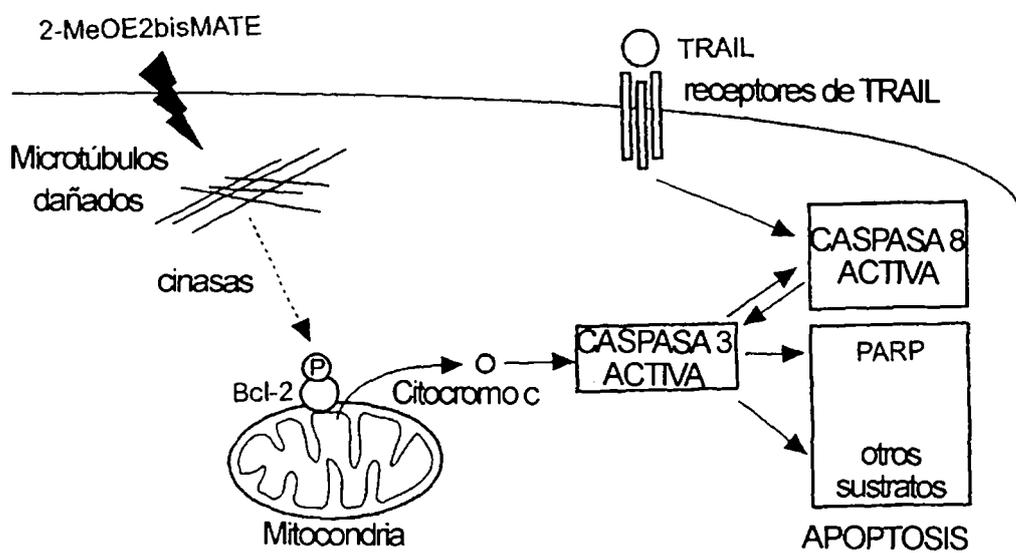


Fig. 8