



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 385**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7024 (2006.01)

A61K 31/26 (2006.01)

A61K 36/31 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08100658 .7**

96 Fecha de presentación : **18.01.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2080516**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.07.2009**

54 Título: **Uso de derivados de isotiocianato como agentes antimieloma.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.08.2011

73 Titular/es: **INDENA S.p.A.**
Viale Ortles, 12
20139 Milano, IT

72 Inventor/es: **Morazzoni, Paolo;**
Manzotti, Carla;
Fontana, Gabriele;
Riva, Antonella y
Iori, Renato

74 Agente: **Lazcano Gainza, Jesús**

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

Uso de derivados de isotiocianato como agentes antimieloma

- 5 La presente invención se refiere al uso de glucomoringina o del correspondiente derivado de isotiocianato como agentes antimieloma.

Antecedentes de la invención

- 10 Las verduras son la fuente más importante de compuestos con actividad quimiopreventiva: entre ellos, los isotiocianatos (ITC) producidos en *Brassicaceae* (por ejemplo brócoli, coles de Bruselas, coliflor, etc.) han despertado actualmente un gran interés desde el primer estudio de Sidransky sobre la inhibición del crecimiento tumoral inducida por ITC [1].

- 15 En las verduras, los ITC se almacenan en forma de precursores inactivos denominados glucosinolatos (GL) y pueden liberarse tras el daño al tejido mediante hidrólisis enzimática que implica mirosinasa (MYR, E.C. 1.2.1.147), una tioglucósido glucohidrolasa que se separa físicamente de los GL en condiciones normales [2,3].

- 20 Como la microflora intestinal de mamíferos, incluyendo seres humanos, tiene actividad de tipo mirosinasa, también pueden convertirse los GL en ITC en su tracto digestivo [4,5].

- Se ha notificado que los ITC son inhibidores del crecimiento tumoral en diferentes estudios preclínicos *in vivo* [6-8] y además estudios epidemiológicos han mostrado una relación inversa entre el consumo dietético de *Brassicaceae* y el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, de mama y de colon [9-11].

- 25 Los ITC tienen muchos efectos a través de los cuales muestran su acción protectora frente a la evolución del cáncer: pueden i) inducir enzimas de fase 2 como la glutatión-S-transferasa (GST) y la quinona reductasa (QR) [12-15] a través de una ruta Nrf-2, ii) provocar apoptosis y detención del ciclo celular [16-18], iii) inhibir enzimas de fase 1 y genes relacionados con NF-κB [19,20].

- 30 En los últimos años se ha estudiado exhaustivamente el sulforano, debido a su papel como agente quimiopreventivo y diversos estudios han demostrado su posible uso como compuesto quimioterápico novedoso [7,11,20].

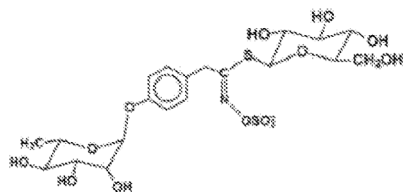
- 35 La glucomoringina (GMG) es un elemento poco común de la familia de los glucosinolatos (GL) y presenta una característica única que consiste en un segundo residuo sacarídico en su cadena lateral. Este GL es un metabolito secundario típico presente en verduras que pertenecen al género *Moringaceae* que consiste en 14 especies, entre las que *M. oleifera* es la más ampliamente distribuida. La *M. oleifera* es un árbol multiuso que crece en muchas regiones tropicales o ecuatoriales. El valor medicinal de las semillas y otras partes de la planta se ha reconocido hace mucho tiempo en la medicina popular [21]. Se ha mostrado que los isotiocianatos glicosilados (GMG-ITC), que resultan de la hidrólisis con mirosinasa de GMG, presentan una amplia actividad biológica y también se ha mostrado que ejercen una actividad promotora antitumoral eficaz [22]. El GMG-ITC puede purificarse en altas cantidades partiendo de GMG pura. El GMG-ITC es un compuesto sólido, inodoro y estable a temperatura ambiente que difiere de otros ITC bioactivos naturales que son líquidos, volátiles, con olor acre.

- 45 El mieloma múltiple es una enfermedad maligna de las células plasmáticas que se caracteriza por destrucción esquelética, insuficiencia renal, anemia e hipercalcemia [23]. La edad mediana en el diagnóstico es de 68 años. El mieloma representa el 1% de todas las enfermedades malignas en la población blanca y el 2% en la población negra y el 13% y el 33% respectivamente, de todos los cánceres hematológicos [24].

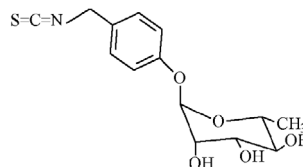
- 50 Los tratamientos para el mieloma incluyen tratamiento de apoyo y quimioterapia en infusión seguido para pacientes jóvenes de quimioterapia de dosis alta y un trasplante autólogo [25]. La explotación de la comprensión de la biología de los mielomas condujo al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos [26]. Aunque se ha realizado un gran avance en el tratamiento de mieloma con estas nuevas terapias, no existe ningún papel en la actualidad para el reemplazamiento de la cura convencional. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevos, agentes más activos y/o alternativos.

Descripción de la invención

- 60 Se ha encontrado ahora que la glucomoringina (GMG) o su des-tio-glucósido (GMG-ITC) que tienen las siguientes fórmulas:



GMG



GMG-ITC

están dotados de una actividad citotóxica notable frente a líneas celulares de mieloma. También se ha confirmado *in vivo* la actividad en modelos experimentales.

La invención se refiere por consiguiente al uso de o bien GMG o bien GMG-ITC para la preparación de un medicamento para el tratamiento de mielomas, particularmente para el tratamiento de mieloma múltiple.

Para el uso terapéutico considerado, se formulará de manera adecuada GMG o GMG-ITC en formas farmacéuticas, particularmente para la administración entérica o parenteral, según métodos bien conocidos.

Los ejemplos de composiciones adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, suspensiones o disoluciones estériles para la inyección intramuscular o intravenosa, y similares. Los protocolos terapéuticos y las dosis reales dependerán como siempre de varios factores, concretamente características farmacocinéticas y toxicológicas, estados del paciente (peso, sexo y edad), estadio de la enfermedad. Un médico experto determinará fácilmente el régimen de dosificación más eficaz según los métodos establecidos. Se cree que las dosis terapéuticas eficaces en seres humanos oscilarán entre 1 mg/kg/día y 30 mg/kg/día, aunque no pueden descartarse dosificaciones mayores también en vista de la toxicidad limitada de tanto GMG como GMG-ITC.

Pueden usarse la GMG y el GMG-ITC como una terapia única o en combinación con otros agentes quimioterápicos conocidos ya disponibles para el tratamiento de mieloma.

La invención se describirá ahora en más detalle en los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1 Aislamiento y purificación de compuestos

Se aislaron GMG y GRA respectivamente de semillas de *Moringa oleifera* L. (fam. *Moringaceae*) y *Brassica oleracea* L. (fam. *Brassicaceae*; var. *acephala*; subvar. *laciniata*). Se purificaron ambos GL en dos etapas secuenciales, mediante intercambio aniónico y cromatografía de exclusión molecular, según métodos notificados anteriormente [27, 28]. Se caracterizaron los GL individuales mediante espectrometría de ^1H y ^{13}C -RMN y se sometió a ensayo la pureza mediante análisis de HPLC del desulfoderivado según el método ISO 9167-1 [29] dando aproximadamente el 99% basado en el valor de área máxima, pero aproximadamente el 90-92% en peso debido a sus altas propiedades higroscópicas. Se aisló la enzima MYR a partir de semillas de *Sinapis alba* L. según un método notificado [30] con algunas modificaciones. La disolución madre usada en el presente estudio tenía una actividad específica de ~60 unidades/mg de proteína soluble y se mantuvo a 4°C tras la dilución en H_2O a 34 U/ml. Se definió una unidad de MYR como la cantidad de enzima que puede hidrolizar 1 $\mu\text{mol/min.}$ de sinigrina a pH 6,5 y 37°C. Se almacenó la disolución de MYR a 4°C en agua destilada estéril hasta su uso. Se produjo GMG-ITC a través de hidrólisis catalizada por mirosinasa de GMG, realizada en tampón fosfato 0,1 M pH 6,5 a 37°C. Se preparó la mezcla de reacción disolviendo 7,0 gramos de GMG pura en 350 ml de tampón y después de añadir 40 U de mirosinasa se mantuvo la disolución a 37°C durante 4-6 horas. Se confirmó la conversión total de GMG pura en GMG-ITC mediante análisis de HPLC del desulfoderivado [29], lo que permitió monitorizar la reducción hasta la desaparición completa de GMG en la mezcla de reacción. Entonces se añadió acetonitrilo a la mezcla hasta que la concentración final fue del 10% y se purificó el GMG-ITC mediante cromatografía en fase inversa, que se realizó usando una columna HR 16/10 empaquetada con LiChrospher RP-C18 (MERCK) o SOURCE 15 RPC (Amersham Biosciences), conectada a un AKTA-FPLC equipado con un colector de fracciones Frac-900 y monitor UV UPC-900 (Amersham Biosciences). Tras lavar con acetonitrilo al 10%, se llevó a cabo una elución con un gradiente hasta acetonitrilo al 60%. Se recogieron las fracciones y se analizaron usando un sistema de HPLC Hewlett-Packard modelo 1100 con una columna Inertsil ODS3 (250 x 3 mm, 5 mm). Se realizó una cromatografía con velocidad de flujo de 1 ml/min. a 30°C eluyendo con un gradiente lineal de agua (A) y acetonitrilo (B) de B desde al 30% hasta el 80% en 20 min. Se detectó la elución de GMG-ITC mediante una red de diodos, monitorizando la absorbancia a 229 nm. Se recogieron las fracciones que contenían GMG-ITC (pureza máxima > 99%), se eliminó el disolvente mediante concentración en un evaporador rotatorio, y se liofilizó la disolución final. Se caracterizó la GMG-ITC y se identificó claramente mediante ^1H y ^{13}C -RMN y técnicas de espectrometría de masas.

EJEMPLO 2 Resultados biológicos

Datos *in vitro*:

La tabla 1 muestra la sensibilidad de la línea de célula tumoral de pulmón humana H460 frente a glucomoringina. El aumento de la concentración de GMG en presencia de mirosinasa da como resultado un efecto citotóxico.

	% de crecimiento de células con respecto al control			
	0	Tratamiento en 24 h	Recuperación en 24 h	Recuperación en 48 h
Controles	100	100	100	100
GMG (100 μ M)	100	98	100	100
GMG (7,5 μ M) + MYR (0,19 U)	100	75	72	80
GMG (10 μ M) + MYR (0,19 U)	100	63	51	69
GMG (15 μ M) + MYR (0,19 U)	100	33	20	24
GMG (20 μ M) + MYR (0,19 U)	100	28	17	8

La actividad citotóxica del isotiocianato derivado de *Moringa* (GMG-ITC) en un conjunto de líneas de células tumorales humanas. En la misma tabla los valores obtenidos con el sulforafano ITC (GRA) como un patrón de referencia se notifican en la siguiente tabla 2.

Líneas celulares	Recuento celular (24 h) (CI50 (μ M))	
	GMG-ITC	GRA
H460 wt	29 $\pm$ 0,8	29 $\pm$ 0,5
H460 S5	18 $\pm$ 6,7	19 $\pm$ 1
MCF7 π	27 $\pm$ 5,7	27 $\pm$ 4
MCF7 NEO	20 $\pm$ 4,4	26 $\pm$ 4
HL60	15 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1
HCT116 p53 ^{+/+}	12 $\pm$ 0,3	17 $\pm$ 2,3
HVT116 p53 ^{-/-}	13 $\pm$ 0,25	18 $\pm$ 5,3
A2780	15 $\pm$ 3	18 $\pm$ 1
RPMI-8226	6 $\pm$ 1	8 $\pm$ 0,2

Los datos notificados en la tabla muestran claramente que los ITC son más citotóxicos en líneas celulares de mieloma en comparación con otras líneas de células tumorales de un tipo de tumor diferente.

Estudios *in vivo*

En la tabla 3 se notifica la actividad antitumoral del GMG-ITC administrado *in vivo* en ratones SCID que portan líneas de células tumorales de mieloma humanas trasplantadas por vía subcutánea.

Compuesto	Programa de tratamiento	Dosis (mg/kg/iny.)	% de TWI
GMG	v.o. q5dx2	400	62
GMG-ITC	i.p q5dx2w	20	70

Cuando se sometió a prueba el GMG-ITC en el carcinoma ovárico humano A2780 la actividad antitumoral fue baja, tal como se notifica en la tabla 4 a continuación.

Compuesto	Programa de tratamiento	Dosis (mg/kg/iny.)	% de TWI
GMG-ITC	i.p q5dx2w	20	46

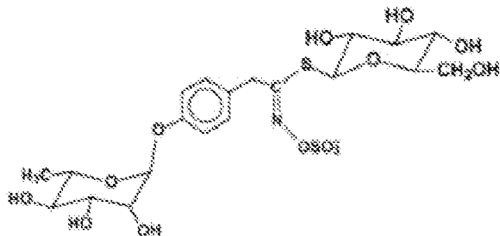
Bibliografía

- 1 Sidransky H, Ito N, Verney E. (1966) Influence of alpha-naphthyl-isothiocyanate on liver tumorigenesis in rats ingesting ethionine and N-2-fluorenylacetamide. *J Natl Cancer Inst.* noviembre de 1966; 37(5):677-86.
- 5 2 Fenwick, G. R., Heaney, R. K. y Mullin, W. J. (1983) Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *CRC Crit. Rev. Food Sci.Nutr.* 18: 123-201
- 3 Fahey, J. W., Zalcmann, A. T. y Talalay, P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5-51.
- 10 4 Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. (1998) Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* diciembre de 1998; 7(12):1091-100
- 15 5 Getahun SM, Chung FL. (1999) Conversion of glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion of cooked watercress. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* mayo de 1999; 8(5):447-51
- 6 Zhang Y, Talalay P. (1994) Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Res.* 1 de abril de 1994; 54(7 Supl):1976s-1981s. Revisión.
- 20 7 Hecht SS. (2000) Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab Rev.* agosto-noviembre de 2000; 32(3-4):395-411. Revisión.
- 8 Conaway, C. C., Yang, Y.-M. y Chung, F.-L. (2002) Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: their biological activities and metabolism in rodents and humans. *Curr. Drug Metab.* 3:233-255.
- 25 9 Fowke JH, Chung FL, Jin F, Qi D, Cai Q, Conaway C, Cheng JR, Shu XO, Gao YT, Zheng W. (2003) Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer. *Cancer Res.* julio de 2003 15; 63(14):3980-6.
- 30 10 Zhao B, Seow A, Lee EJ, Poh WT, Teh M, Eng P, Wang YT, Tan WC, Yu MC, Lee HP.(2001) Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase -M1, - T1 polymorphisms and lung cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* octubre de 2001; 10(10):1063-7
- 35 11 Conaway CC, Wang CX, Pittman B, Yang YM, Schwartz JE, Tian D, McIntee EJ, Hecht SS, Chung FL. (2005) Phenethyl isothiocyanate and sulforaphane and their N-acetylcysteine conjugates inhibit malignant progression of lung adenomas induced by tobacco carcinogens in A/J mice. *Cancer Res.* 15 de septiembre; 65(18):8548-57.
- 40 12 Steinkellner, H., Rabot, S., Freywald, C., Nobis, E., Scharf, G., Chabicovsky, M., Knasmüller, S. y Kassie, F. (2001) Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolising enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutat. Res.* 480-481: 285-297.
- 13 Talalay, P. & Fahey, J. W. (2001) Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *J. Nutr.* 131: 3027S-3033S.
- 45 14 Brooks, J. D., Paton, V. G. y Vidanes, G. (2001) Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 10: 949-954.
- 50 15 McWalter GK, Higgins LG, McLellan LI, Henderson CJ, Song L, Thornalley PJ, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. (2004) Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates. *J Nutr* diciembre; 134(12 Supl):3499S-3506S.
- 55 16 Filmognari C, Nusse M, Cesari R, Iori R, Cantelli-Forti G, Hrelia P. Growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate, *Carcinogenesis* 2002; 23(4):581-6.
- 17 Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res* 2001; 61(16):6120-30.
- 60 18 Srivastava SK, Singh SV. Cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of nuclear factor kappa B activation in anti-proliferative activity of benzyl isothiocyanate against human pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 2004; 25(9):1701-9.

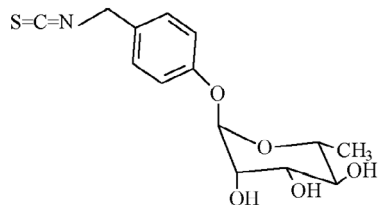
- 19 Xu C, Shen G, Chen C, Gelinas C, Kong AN. (2005) Suppression of NF-kappaB and NF-kappaB-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through IkappaBalpha, IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells. *Oncogene*. 30 de junio; 24(28):4486-95.
- 5 20 Heiss E, Herhaus C, Klimo K, Bartsch H, Gerhauser C. (2001) Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J Biol Chem*. 2001 24 de agosto; 276(34):32008-15.
- 21 Anwar F., Latif S., Ashraf M., Gilani A.H. (2007) *Moringa oleifera*: A food plant with multiple Medicinal Uses. *Phytother Res* 21 17-25.
- 10 22 Guevara A.P., Vargas C., Sakurai H., Fujiwara Y., Hashimoto K., Maoka T., Kozuka M., Ito Y., Tokuda H., Nishino H. (1999) An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutation Research* 440: 181-188.
- 23 Kyle RA, Rajkumar SV (2004). Plasma cell disorder. En Goldman L., Ausiello DA., eds. *Cecile textbooks of medicine*. 22ª ed. Filadelfia: W.B. Saunders: 1184-95.
- 15 24 Longo PL (2001). Plasma cell disorders. En Braunwald E, Kasper D, Fauci A. eds *Harrison's principles of internal medicine*, 15ª edn, vol. 1:727-33.
- 20 25 Kyle RA, Rajkumar SV (2004). Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 351: 1860-73.
- 26 Sirohi B., Powles R. (2004) Multiple Myeloma. *The Lancet*, vol 363: 875-887.
- 27 Barillari J, Gueyrard D, Rollin P, Iori R. (2001) *Barbarea verna* as a source of 2-phenylethyl glucosinolate, precursor of cancer chemopreventive phenylethyl isothiocyanate. *Fitoterapia* 72, 760-764.
- 25 28 Barillari J, Canistro D, Paolini M, Ferroni F, Pedulli GF, Iori R, V/algimigli L. (2005) Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts. *J. Agric. Food Chem*. 53, 2475-2482.
- 30 29 Reglamento CEE n.º 1864/90 (1990) Anexo VIII. *Offic. Eur. Commun. L 170*: 27-34
- 30 Pessina A, Thomas RM, Palmieri S, Luisi PL. (1990) An improved method for the purification of myrosinase and its physicochemical characterization. *Arch. Biochem. Biophys*. 280; 383-389.

REIVINDICACIONES

1. Uso de glucomoringina y de su des-tio-glucósido que tienen las siguientes fórmulas:



GMG



GMG-ITC

5

para la preparación de un medicamento para el tratamiento de mieloma.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es glucomoringina.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es des-tio-glucósido de glucomoringina.
4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el mieloma es mieloma múltiple.