

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 069**

21 Número de solicitud: 201230476

51 Int. Cl.:
A61K 31/137 (2006.01)
C07C 211/30 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **29.03.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
29.06.2012

71 Solicitante/s:
HOSPITAL SANT JOAN DE DEU
Pº Sant Joan de Déu, 2
08950 Esplugues de Llobregat , Barcelona, ES y
FUNDACIÓ CELLEX

72 Inventor/es:
DE TORRES GÓMEZ-PALLETE, Carmen

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

54 Título: **Cinacalcet y tumores neuroblásticos**

57 Resumen:

Cinacalcet y tumores neuroblásticos.

La presente invención pertenece al campo de la terapia de tumores pediátricos o del desarrollo. En concreto, se refiere al uso del activador alostérico del receptor sensor de calcio, cinacalcet, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores neuroblásticos, en particular para el tratamiento de neuroblastomas, ganglioneuroblastomas y ganglioneuromas.

ES 2 384 069 A1

DESCRIPCIÓN

Cinacalcet y tumores neuroblásticos

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de los tumores pediátricos o del desarrollo. En concreto, se refiere al uso del activador alostérico del receptor sensor de calcio, cinacalcet, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores neuroblásticos.

10

Antecedentes de la invención

Se conocen como tumores del desarrollo aquellos que se manifiestan principalmente durante la edad pediátrica o que únicamente se manifiestan en esta etapa. Por esta razón a veces se les denomina también tumores pediátricos. En el contexto de la presente invención se usará indistintamente el término tumor del desarrollo o tumor pediátrico.

15

Dentro del grupo de los tumores del desarrollo están los neuroblastomas (NB), ganglioneuroblastomas (GNB) y ganglioneuromas (GN), que conforman el grupo de los tumores neuroblásticos (TN). Los TN son los tumores sólidos extracraneales más frecuentes de la infancia y se desarrollan a partir de células de la cresta neural ya comprometidas en la formación del sistema nervioso periférico, por lo que se localizan en la médula suprarrenal o en los ganglios nerviosos de la cadena simpática paravertebral. La mayoría de los NB localizados, GNB y GN presentan índices de supervivencia excelentes, pero los NB metastásicos, pese a ser sometidos a terapias intensivas multimodales, tienen aún hoy día índices de supervivencia que rondan el 40%.

20

Los TN son un grupo de tumores muy heterogéneo desde el punto de vista clínico, anatomopatológico, genético y biológico. Las bases biológicas responsables de la diversidad clínica de los TN se conocen sólo parcialmente, pero se hallan sin duda tras las diferentes formas de respuesta de los tumores a los protocolos de tratamiento. Entre ellas, destacan las alteraciones de la ploidía, las translocaciones desequilibradas, las deleciones o ganancias de regiones cromosómicas recurrentes y la amplificación del oncogén *MYCN*. Estas alteraciones genético-moleculares, aunque cruciales para el comportamiento biológico de los TN, apenas pueden ser modificadas terapéuticamente. Antes de que se describieran muchas de ellas, se sabía que los TN más diferenciados y con mayor proporción de componente estromal tipo Schwann (NB en diferenciación, GNB y GN) se asociaban a mejor pronóstico que los NB indiferenciados. Se han descubierto algunas de las vías moleculares responsables de los procesos de diferenciación celular en TN. Estas rutas son de gran importancia terapéutica ya que son modulables farmacológicamente. Así, por ejemplo, el ácido retinoico induce diferenciación en líneas celulares de NB y en los tumores de los pacientes, mejorando la supervivencia global de un subgrupo de ellos. Algunos NB son resistentes a la acción de este fármaco, pero la falta de un conocimiento detallado de los mecanismos moleculares responsables de la diferenciación de los TN dificulta el diseño de nuevos agentes diferenciadores que puedan beneficiar a un mayor número de pacientes.

25

30

35

40

El gen del receptor sensor de calcio (CASR) fue clonado en 1993 a partir de células paratiroides bovinas y forma parte de la familia C de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), junto a ocho receptores del glutamato, dos receptores GABA-B, algunos receptores del gusto y el sensor de aminoácidos GPRC6A. Esta familia de receptores detecta señales de iones, aminoácidos y nutrientes, entre otros, y las transmiten al medio intracelular. Todos ellos comparten una estructura similar que se compone de un gran dominio extracelular amino-terminal, siete hélices transmembrana y una cola intracelular carboxilo-terminal. En el caso de CASR, su principal función es detectar las fluctuaciones del Ca^{2+} extracelular y regular consecuentemente la secreción de hormona paratiroidea (PTH) en las glándulas paratiroides y de calcitonina en las células C del tiroides, hormonas encargadas de normalizar la calcemia. En el contexto de las paratiroides, la activación de CASR por el calcio se traduce en una disminución de la regulación y producción de la hormona paratiroidea (PTH), lo que a su vez disminuirá la concentración plasmática de calcio para mantenerla dentro de un estrecho margen (1,1-1,3 mM).

45

50

Se ha hallado expresión de CASR en distintas neoplasias con la particularidad de que se le atribuyen funciones muy distintas, incluso contrapuestas, en diferentes contextos tumorales. Así, por ejemplo, se ha descrito que la activación de CASR promueve proliferación y metástasis en carcinoma de próstata, mientras que los datos parecen apoyar que participa en los procesos de diferenciación en carcinoma de colon.

55

Existen agonistas directos de CASR (o agonistas de tipo 1) y activadores alostéricos de CASR (o agonistas de tipo 2). Los primeros, como son Ca^{2+} , Mg^{2+} , Gd^{3+} , neomicina, L-aminoácidos, activan CASR mediante interacción directa con el dominio extracelular del mismo. En cambio, los activadores alostéricos no activan al receptor por sí mismos sino que alteran su estructura tridimensional, de manera que se torna más sensible al estímulo del calcio. El cinacalcet es un activador alostérico del receptor sensor de calcio. En la patente US 5.688.938 se describen varios agonistas de CASR, como NPS R-467 y NPS R-568, siendo NPS R-568 (referido también como R-568) el más activo. Asimismo, la patente US 6.296.833 describe el uso de agonistas o antagonistas del calcio

60

65

para el tratamiento de cáncer. En la presente solicitud se describe el uso de cinacalcet para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores neuroblásticos. Sorprendentemente el uso de cinacalcet resulta en importantes ventajas ya que es capaz de inducir apoptosis de células tumorales a menor concentración que otros agonistas de CASR.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere al uso de cinacalcet para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores neuroblásticos, en particular para el tratamiento de neuroblastomas, ganglioneuroblastomas y ganglioneuromas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. A) Morfología de células SK-N-LP con (paneles inferiores) o sin (paneles superiores) sobre-expresión de CASR tras 16 horas sometidas a privación de suero y posterior exposición a 3 mM CaCl_2 durante 24 y 48 horas. B) Análisis de viabilidad celular en la línea celular SK-N-LP, con sobre-expresión de CASR (barra negra) o sin sobre-expresión de CASR (barra vacía), tras 16 horas de privación de suero y exposición posterior a 0,5 mM, 1,4 mM o 3 mM CaCl_2 durante 48 horas. C) Análisis mediante *Western blot* de la activación de caspasa 3 y clivaje de PARP en células SK-N-LP nativas (*wild type*, WT) y en células SK-N-LP con sobre-expresión de CASR (CASR) tras ser expuestas durante 24 h (dos primeros carriles) y 48 h (dos últimos carriles) al modelo *in vitro* descrito en el apartado A.

Figura 2. Viabilidad celular de líneas celulares nativas de neuroblastoma tratadas *in vitro* con cinacalcet o con NPS R-568 durante 72 horas. Se representa el porcentaje de viabilidad respecto al control frente a la concentración (Conc.) en μM de cinacalcet (circulo) o R-568 (cuadrado). Las líneas celulares analizadas son las siguientes: LAN-1 (Fig. 2A), SK-N-LP (Fig. 2B), SK-N-JD (Fig. 2C), SK-N-BE(2)c (Fig. 2D), LA1-5s (Fig. 2E), LA1-55n (Fig. 2F) y SK-N-AS (Fig. 2G).

Figura 3. Examen morfológico de xenoinjertos generados a partir de las líneas celulares LAN-1 (Fig. 3A, 3C, 3E) y SK-N-LP (Fig. 3B, 3D, 3F) tratados con cinacalcet (Fig. 3C-3F) o no (Fig. 3A, 3B). Se muestran especímenes en los que el cinacalcet produjo mayoritariamente muerte celular (Fig. 3C, 3D) o citodiferenciación (Fig. 3E, 3F).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en un aspecto al uso de cinacalcet para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores neuroblásticos. En una realización particular, se refiere al uso de cinacalcet para la preparación de un medicamento para el tratamiento de neuroblastomas. En otra realización particular, se refiere al uso de cinacalcet para la preparación de un medicamento para el tratamiento de ganglioneuroblastomas. En otra realización particular, se refiere al uso de cinacalcet para la preparación de un medicamento para el tratamiento de ganglioneuromas.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a cinacalcet para uso en el tratamiento de tumores neuroblásticos, en particular para uso en el tratamiento de neuroblastomas. Otra realización particular se refiere a cinacalcet para uso en el tratamiento de ganglioneuroblastomas y otra realización particular se refiere a cinacalcet para uso en el tratamiento de ganglioneuromas.

Como se ha mencionado en el apartado de antecedentes, la patente US 5.688.938 describe NPS R-568 como el compuesto agonista de CASR más activo. A este respecto, en la presente invención se llevan a cabo ensayos comparativos de los efectos del uso de cinacalcet y R-568 en el tratamiento de tumores neuroblásticos. Sorprendente, cinacalcet presenta una serie de ventajas frente a NPS R-568 desde el punto de vista farmacológico y farmacodinámico. Uno de los efectos más importantes y sorprendentes del cinacalcet es la inducción de apoptosis a concentraciones significativamente más bajas que el NPS R-568 (Figura 2, Tabla 1). Esto supone importantes ventajas del cinacalcet frente a otros agonistas de CASR ya que permite un tratamiento efectivo con la administración de una dosis menor de medicamento lo que en general implica menor riesgo de que aparezcan efectos secundarios o toxicidad y mayor tolerancia al tratamiento, además de facilitar la administración y pauta de administración. Estas ventajas se muestran especialmente relevantes cuando un fármaco debe ser administrado de manera sostenida en el tiempo, como puede ser el caso del cinacalcet administrado para el tratamiento de los tumores neuroblásticos. Estos tumores presentan frecuentes recaídas, lo que hace previsible que este tratamiento, igual que otros utilizados en el contexto de enfermedad mínima residual para evitar la recaída, deba ser administrado de manera continuada durante un largo periodo de tiempo. Asimismo, es posible que si un tumor ha respondido adecuadamente al tratamiento inicial con cinacalcet se pueda beneficiar de la re-utilización de este fármaco en caso de reaparecer (tras la remisión inicial), estrategia que se ha mostrado útil con diversos tratamientos en oncología (*rechallenging*).

Ejemplos

A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que sirven para ilustrar la invención.

EJEMPLO 1. A nálisis de los efectos pro movidos *in vitro* por la activación de CASR mediante calcio en líneas celulares de neuroblastoma con o sin sobre-expresión de CASR.

Células SK-N-LP nativas, establemente transfectadas con pCMV-GFP o con pCMV-CASR-GFP (1×10^6) en RPMI 10% FBS fueron sembradas en placas P100. Al día siguiente, el medio fue sustituido por uno libre de suero (DMEM libre de calcio suplementado con albúmina bovina 0,2%, 4 mM L-glutamina y 0,5 mM CaCl_2). Este se mantuvo durante 16 horas, antes de sustituirlo por el mismo medio suplementado o no con CaCl_2 hasta 3 mM. Se observó así que las células con sobre-expresión de CASR sufrían muerte celular en este modelo cuando eran expuestas a 3 mM CaCl_2 (Figura 1A, panel inferior) pero no a 0,5 mM (datos no mostrados). Este fenómeno, que se iniciaba sobre las 6 horas tras el tratamiento con calcio y era masivo a partir de las 48 horas, apenas era apreciable en las líneas celulares nativas o transfectadas con pCMV-GFP (Figura 1A, panel superior). En estas últimas, se detectaron indicios de muerte celular, pero las células continuaron proliferando hasta alcanzar confluencia, mientras que las células con sobre-expresión de CASR desaparecieron completamente en 5 días.

Para cuantificar la disminución de la viabilidad celular, se realizó el mismo modelo en placas de 24 pocillos en las líneas y clones mencionados más arriba (Figura 1B). A las 48 horas, se cuantificó el porcentaje de células viables mediante el sistema *CellTiter 96(r) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (MTS) de Promega. Se observó así que la viabilidad celular de las células con sobre-expresión de CASR (barra negra, Figura 1B) disminuía significativamente más que la de la línea celular SK-N-LP nativa (barra vacía, Figura 1B).

Con el fin de determinar si el proceso de muerte celular tenía lugar mediante apoptosis, se extrajeron proteínas totales de células SK-N-LP nativas (*wild-type*, WT) y con sobre-expresión de CASR (CASR) a las 24 y 48 horas de exposición a este modelo. Las proteínas fueron sometidas a electroforesis en gel SDS-PAGE, transferidas a membrana de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos específicos para detectar caspasa 3 activada y c-PARP (*Cell Signaling*). Se utilizaron anticuerpos secundarios apropiados marcados con peroxidasa y el revelado se efectuó con el sistema ECL de Amersham. Así, se puso de manifiesto que la muerte celular inducida por activación de CASR mediante calcio se acompaña de activación de caspasa 3 y clivaje de PARP (Figura 1C), lo cual es compatible con muerte celular por apoptosis.

EJEMPLO 2. Análisis de los efectos s obre la viabilidad celular promovidos *in vitro* por cinacalcet y NPS R-568 en siete líneas celulares de neuroblastoma.

Se sembraron 5×10^3 células de cada línea celular (LAN-1, SK-N-BE(2)c, LA1-55n, LA1-5s, SK-N-LP, SK-N-JD, SK-N-AS) en placas de 96 pocillos (6 réplicas por condición). Al día siguiente, se retiró el medio inicial (RPMI 10% FBS) y se sustituyó por el mismo medio conteniendo concentraciones diversas (100 μM , 65 μM , 30 μM , 25 μM , 20 μM , 15 μM , 10 μM , 5 μM , 3 μM , 1 μM , 0,3 μM) de cinacalcet (Selleck Biochemicals) o NPS R-568 (Tocris) o cantidades equivalentes de DMSO (Sigma-Aldrich). A las 72 horas, se evaluó la viabilidad celular mediante la cuantificación del porcentaje de células viables mediante el sistema *CellTiter 96(r) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (MTS) de Promega. Se observó así que ambos fármacos inducían una disminución de la viabilidad celular en las 7 líneas celulares examinadas (Figura 2), y que en 5 de ellas la IC₅₀ (concentración de fármaco que produce la muerte del 50% de las células con respecto al control) de cinacalcet era menor que la de NPS R-568 de manera estadísticamente significativa (Tabla 1). En el caso de las líneas celulares SK-N-AS y LA1-55n la diferencia en el efecto promovido por ambos fármacos no fue estadísticamente significativa (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de IC₅₀ obtenidos al tratar con cinacalcet o NPS R-568 siete líneas celulares nativas de neuroblastoma.

Línea celular Cin	acalcet	NPS R-568	P valor
LAN-1	17,19	24,81	< 0,0001
SK-N-LP	10,31	22,38	< 0,0001
SK-N-JD	10,92	25,82	< 0,0001
SK-N-BE(2)C	10,69	16,65	< 0,0001
LA1-5s	16,73	34,5	< 0,0001
LA1-55n	10,52	11,42	no significativo
SK-N-AS	10,26	15,14	no significativo

EJEMPLO 3. Análisis de los efectos del tratamiento con cinacalcet en un modelo *in vivo* de neuroblastoma.

Se generaron xenoimplantes de las líneas celulares LAN-1 y SK-N-LP para lo cual alícuotas de 10×10^6 células provenientes de dichas líneas celulares fueron inoculadas subcutáneamente en ratones hembra atímicos *nu/nu* de 4-6 semanas (Charles Rivers). A partir del día 12, cuando el tumor en formación ya era medible con pie de rey, se inició tratamiento 6 días por semana con cinacalcet 100 mg/kg por vía oral (Figura 3C-3F) y con el vehículo como control negativo (Figura 3A y 3B). Se midió el volumen tumoral cada 2-3 días. A los 40 días, los ratones fueron sacrificados. Cada tumor fue pesado, antes de ser fraccionado en dos mitades: una fue congelada en nitrógeno líquido para análisis de expresión y la otra fue fijada y parafinada para examen morfológico y análisis inmunohistoquímicos. En el análisis morfológico de los xenoimplantes de ambas líneas celulares tratados con cinacalcet, se observaron especímenes en los que había grandes áreas con necrosis y/o apoptosis (Figura 3C y 3D) y/o signos morfológicos de diferenciación en las células que eran viables (Figura 3E y 3F).

REIVINDICACIONES

- 5 1) Uso de cinacalcet para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores neuroblásticos.
- 2) Uso según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de neuroblastomas.
- 10 3) Uso según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de ganglioneuroblastomas.
- 4) Uso según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de ganglioneuromas.
- 15

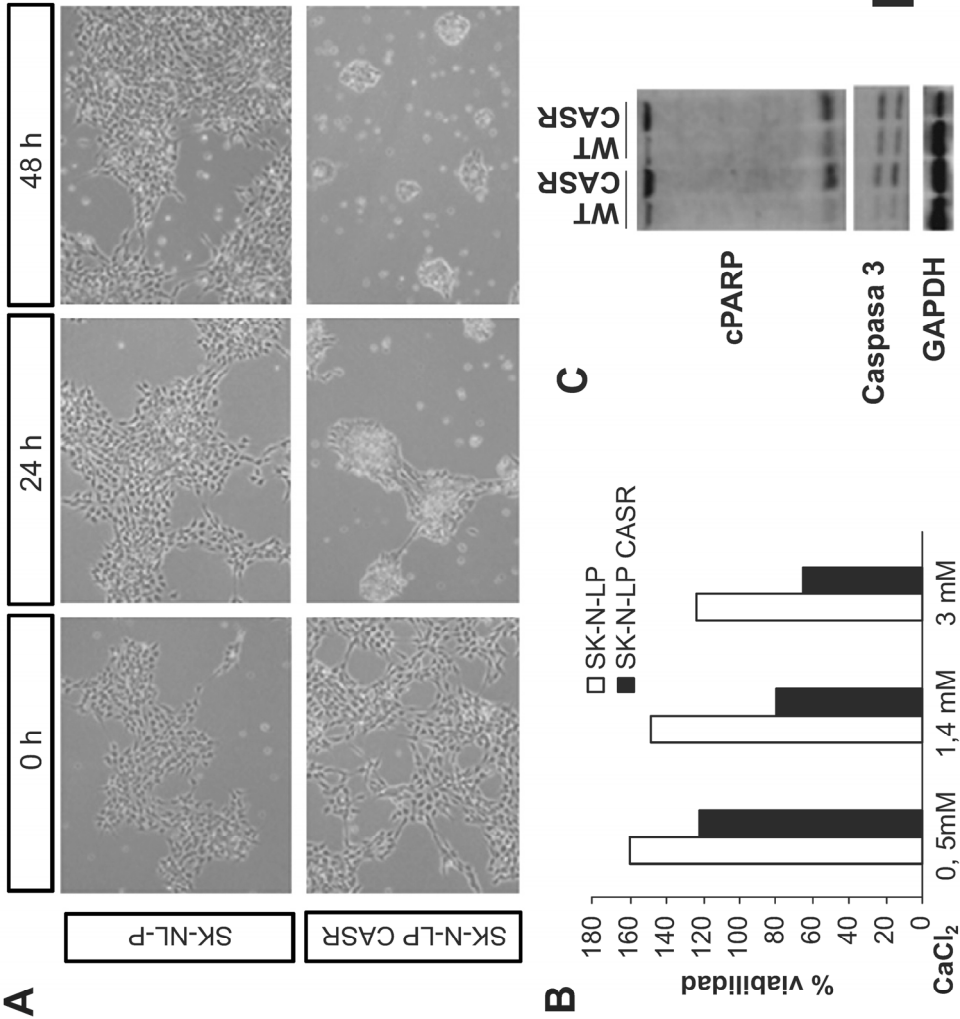


FIG. 1

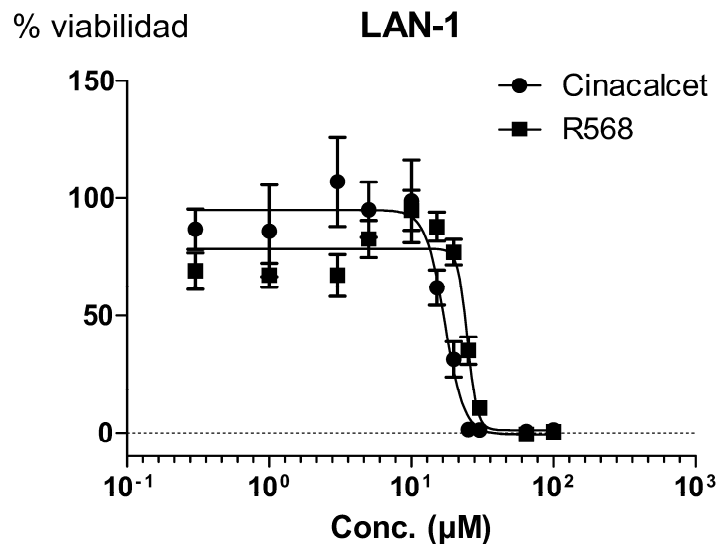


FIG. 2A

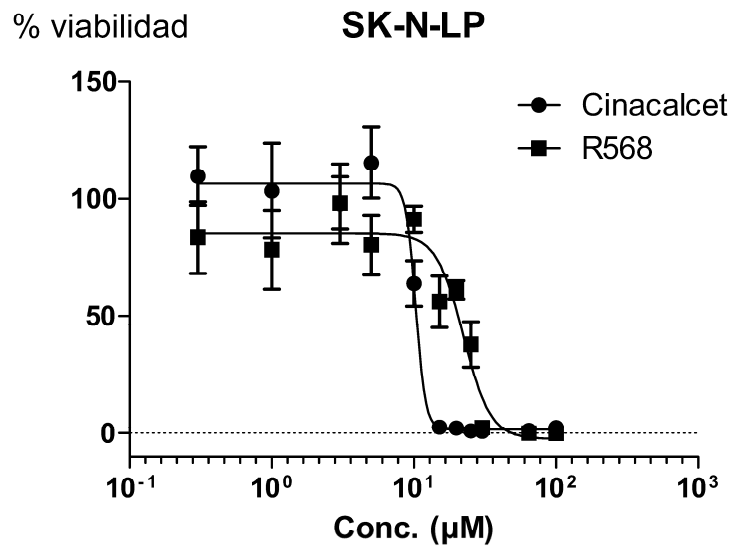


FIG. 2B

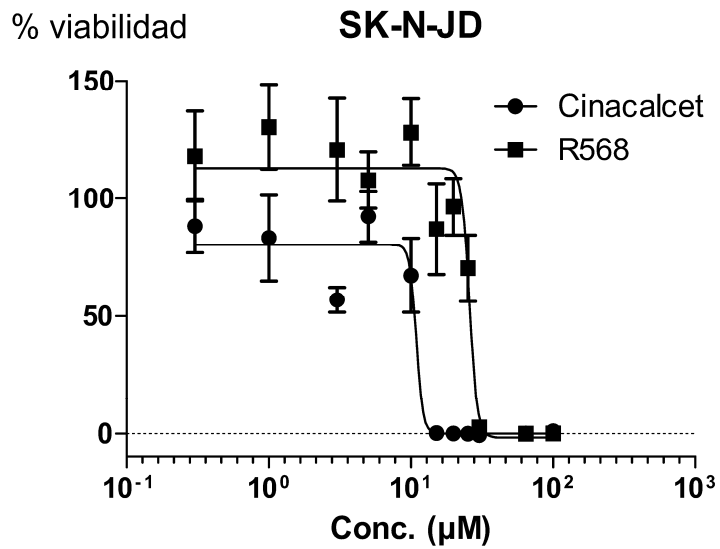


FIG. 2C

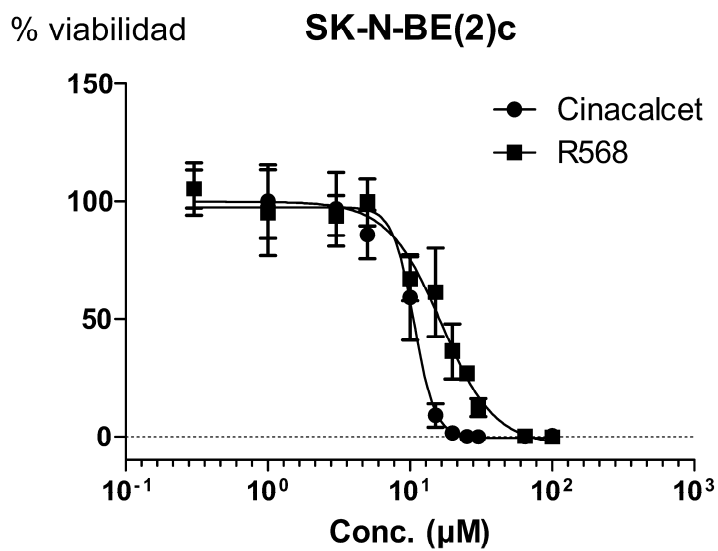


FIG. 2D

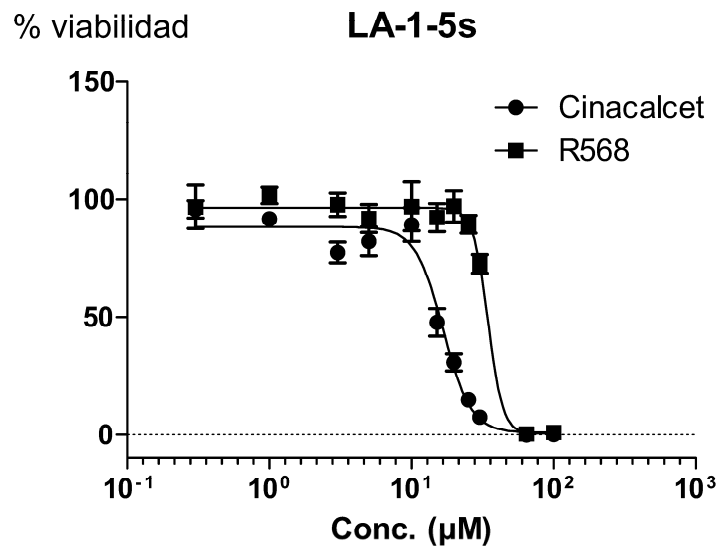


FIG. 2E

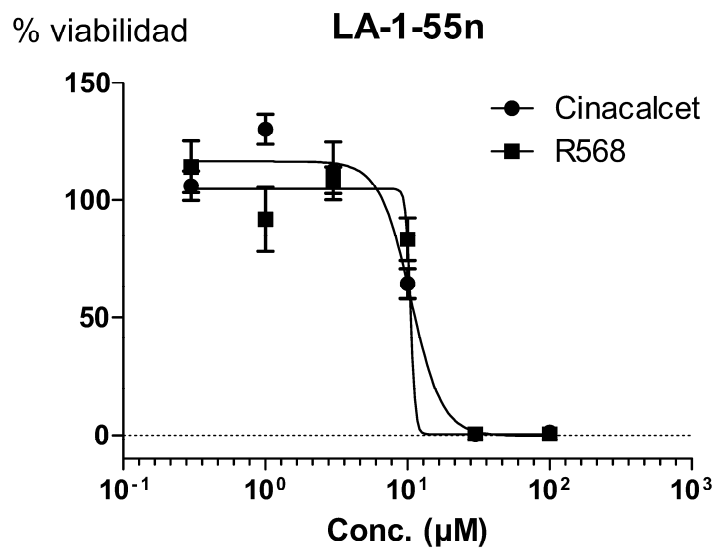


FIG. 2F

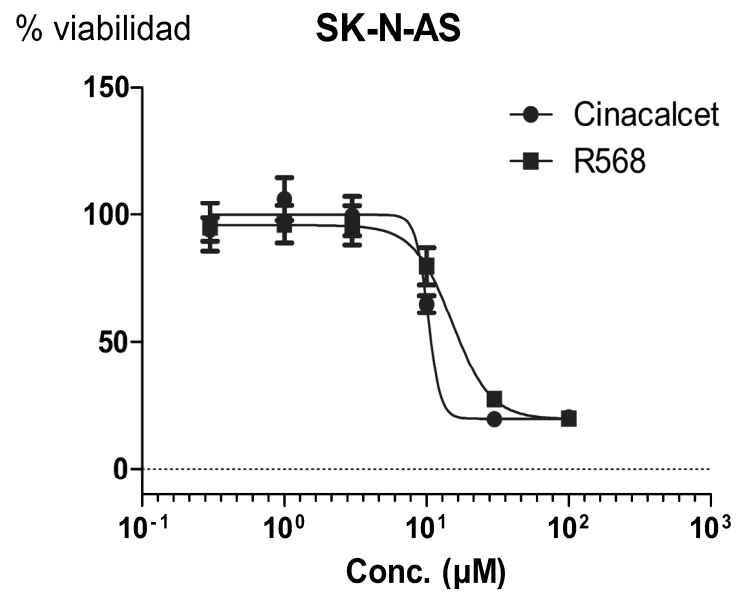


FIG. 2G

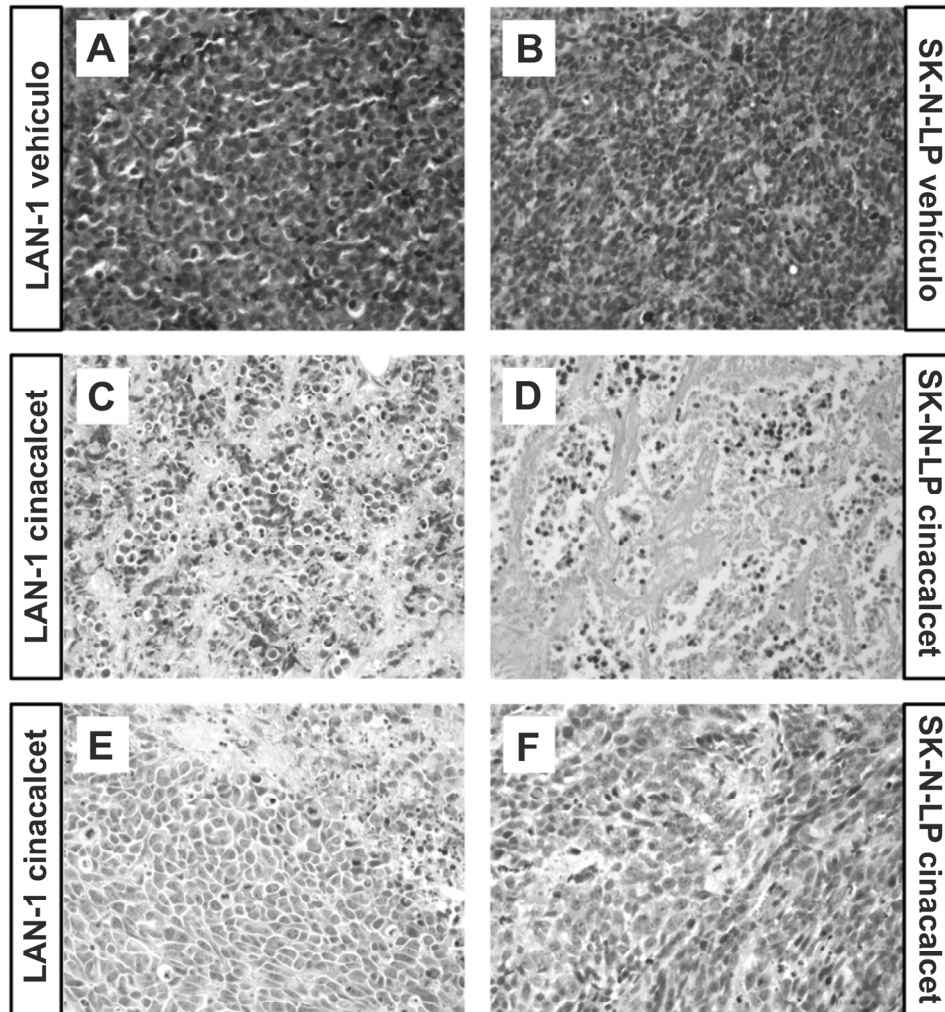


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201230476

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.03.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/137** (2006.01)
C07C211/30 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TORRES C. et al., "The calcium-sensing receptor and parathyroid hormone-related protein are expressed in differentiated, favorable neuroblastic tumors." Cancer (2009), vol. 115, pág. 2792-2803. Todo el documento.	1-4
A	US 5688938 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 18.11.1997, todo el documento. Citado en la solicitud	1-4
A	WO 9938500 A2 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 05.08.1999, todo el documento. Citado en la solicitud	1-4
A	WO 2010063847 A1 (UNIV VICTOR SEGALEN BORDEAUX 2) 10.06.2010, todo el documento.	1-4
A	EP 2286836 A1 (AJINOMOTO KK) 23.10.2011, todo el documento.	1-4
A	WO 2008075173 A2 (UNIV RUPRECHT KARLS HEIDELBERG) 26.06.2008, todo el documento.	1-4
A	US 2002132224 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 19.09.2002, todo el documento.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.06.2012

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07C

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, CAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.06.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	TORRES C. et al., "The calcium-sensing receptor and parathyroid hormone-related protein are expressed in differentiated, favorable neuroblastic tumors." Cancer (2009), vol. 115, pág. 2792-2803. Todo el documento.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención pertenece al campo de la terapia de tumores pediátricos o del desarrollo. En concreto, se refiere al uso del activador alostérico del receptor sensor de calcio, cinacalcet, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores neuroblásticos, en particular para el tratamiento de neuroblastomas, ganglioneuroblastomas y ganglioneuromas.

1.- NOVEDAD

Ninguno de los documentos del estado de la técnica reflejado en el informe de búsqueda describe el uso de cinacalcet para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores neuroblásticos, en particular para el tratamiento de neuroblastomas, ganglioneuroblastomas y ganglioneuromas. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-4 cumplen con el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP 11/1986

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

El documento D01 se considera el estado de la técnica más cercano al objeto de la invención. El estudio realizado demuestra la participación del receptor sensor de calcio (CaR) y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) en los procesos de diferenciación de tumores neuroblásticos. En este sentido, en la discusión, los autores mencionan la necesidad de profundizar más en este mecanismo para poder evaluar si la modulación farmacológica de CaR pudiera representar una alternativa a las terapias utilizadas en el tratamiento de los neuroblastomas.

En opinión de esta Oficina, la información aportada en D01 se considera información relacionada con el objeto de la invención pero en ningún caso relevante en cuanto su actividad inventiva. En consecuencia, las reivindicaciones 1-4 cumplen con el requisito de actividad inventiva recogido en el Art 8.1 LP 11/1986