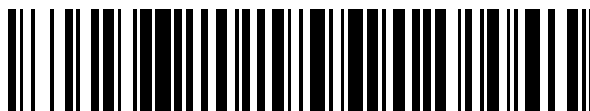


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 841**

51 Int. Cl.:

C07D 271/08 (2006.01)

A61K 31/4245 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2011 E 11711666 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2539328**

54 Título: **Derivados de furoxano solubles en agua que tienen actividad antitumoral**

30 Prioridad:

23.02.2010 IT MI20100287

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

18.11.2014

73 Titular/es:

HUMANITAS MIRASOLE S.P.A. (50.0%)
Via Manzoni, 56
20089 Rozzano (Milano), IT y
ISTITUTO ONCOLOGICO VENETO IRCCS (50.0%)

72 Inventor/es:

VIOLA, ANTONELLA;
BRONTE, ENZO;
CROSETTI, MARCO;
LAZZARATO, LORETTA;
FRUTTERO, ROBERTA y
GASCO, ALBERTO

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 522 841 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de furoxano solubles en agua que tienen actividad antitumoral

5 **Campo de la invención**

La presente invención encuentra aplicación en el campo de la medicina y, en particular, se refiere a compuestos solubles en agua novedosos con estructura de furoxano que pueden inhibir rutas metabólicas implicadas en el desarrollo de los tumores.

10

Técnica anterior

El cáncer de próstata es la segunda causa de muerte en la población masculina de los países occidentales. En el caso de cáncer localizado, la prostatectomía radical y la radioterapia local han revelado ser eficaces, mientras que en el caso del carcinoma de próstata metastásico (PCa), desafortunadamente han revelado escasas propiedades de curación.

15

Por tanto, es necesario encontrar terapias alternativas para el cáncer de próstata metastásico que no responde a los tratamientos hormonales. El éxito de tal enfoque depende de la capacidad de las células T citotóxicas para eliminar las células tumorales. Sin embargo, si el entorno tumoral ejerce una acción de supresión sobre la acción de los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) específicos de antígeno, la inmunoterapia tiene escaso éxito.

20

Por tanto, es de importancia fundamental la comprensión de la biología de las células TIL y la modulación de la respuesta de las mismas por el tumor.

25

El papel del entorno tumoral prostático en la modulación de la respuesta de las células T se analizó mediante el uso de cultivo de PCa humano en una matriz de colágeno. Esta técnica ofrece la ventaja de mantener intacto el microentorno, así como todos los factores que pueden influir en la actividad de las células TIL, tales como la interacción célula-célula o la interacción entre una célula unida a la matriz y el líquido intersticial. Este nuevo enfoque ha permitido obtener resultados considerables. Generalmente, los TIL en las muestras de PCa son principalmente linfocitos T CD8+ (CD8+, CF45RA+, CD62L- y CCR7-) diferenciados y positivos para perforina, y por tanto pueden eliminar potencialmente las células cancerosas. Sin embargo, estas últimas están en estado durmiente, dado que no expresan marcadores de activación como CD25, CD69 y CD137. Además, al contrario que los linfocitos presentes en tejidos de próstata no tumorales y en la sangre periférica, los TIL no tienen respuesta a las señales de activación que actúan o bien sobre los TCR o bien sobre las rutas de señalización posteriores, lo que indica una deficiencia restringida al tumor. Adicionalmente, ha habido una amplia evidencia de que las enzimas arginasa (ARG) y NO-sintasa (NOS) se sobreexpresan en PCa en comparación con la próstata hiperplásica, revelando la interesante observación de que realmente las células tumorales y no las células mieloides infiltrantes podrían ser la principal fuente de enzimas. Los resultados indican que la regulación en estado estacionario del estado durmiente de los TIL depende del metabolismo antitumoral aumentado del aminoácido L-arginina (L-Arg), dado que la simple adición de inhibidor de NOS y ARG fue suficiente para producir los CTL, activarlos y comenzar una serie de acontecimientos que conducen a la polarización citolítica de los gránulos y a la eliminación de la diana. Además, también se demostró que la presencia de altos niveles de nitrotirosina en los TIL, que sugiere la producción local de peroxinitrito, se debe posiblemente a la actividad de ARG y NOS, dado que inhibir la actividad de las enzimas también conduce a nitración de tirosina reducida.

30

35

40

45

Estos resultados identifican un mecanismo a través del cual el cáncer de próstata humano induce inmunosupresión *in situ*. Por tanto, los principios activos que controlan la generación de especies reactivas de nitrógeno (RNS) podrían ser útiles en el enfoque inmunoterápico para el tratamiento del cáncer, creando un entorno tumoral favorable para la activación de los linfocitos (Bronte *et al.*, 2005).

50

Los resultados de los ensayos clínicos revelaron que la eficacia de los diferentes enfoques inmunoterápicos no es adecuada para una transferencia inmediata y amplia al tratamiento terapéutico en pacientes.

55

Un importante concepto emergente es que el metabolismo alterado presente en el microentorno tumoral puede tener un profundo impacto sobre la actividad antitumoral. Considerando los resultados mencionados anteriormente, está claro que los principios activos que controlan la generación de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) pueden aumentar considerablemente el impacto de los enfoques inmunoterápicos para el tratamiento de cáncer.

60

Los adyuvantes convencionales ya conocidos, tales como las citocinas y los activadores del antígeno que presentan las células, se caracterizan por una amplia actividad sobre el sistema inmunitario, pero carecen de selectividad y pueden conducir a considerables efectos adversos.

65

Por tanto, continuamente surge la necesidad de encontrar compuestos novedosos libres de tales inconvenientes.

El documento de la técnica anterior J. Med. Chem. 2003, 46, 747-754 da a conocer ésteres de aspirina como

donador de NO.

Sumario de la invención

5 Por tanto, el fin de la presente invención es proporcionar compuestos novedosos que puedan interferir con algunas rutas metabólicas correlacionadas con el desarrollo de tumores y que potencien la función de los linfocitos antitumorales presentes espontáneamente, generados en el paciente tras la vacunación o transferidos tras terapia celular (ACT).

10 **Objeto de la invención**

Un primer objeto de la invención se refiere a los compuestos de N-óxido de 1,2,5-oxadiazol solubles en agua de fórmula (II), (III) y (IV) de la reivindicación 1.

15 En un segundo objeto, la invención describe estos compuestos para su uso como medicamento y, en un aspecto preferido, para su uso como medicamento en la terapia de patologías caracterizadas por la generación de especies reactivas de nitrógeno.

20 Según un aspecto incluso más preferido, tales patologías comprenden neoplasias, enfermedades inflamatorias o infecciones crónicas.

Los compuestos se describen en particular para su uso en el tratamiento de cáncer de próstata.

25 En un objeto adicional, los compuestos descritos en la invención se usan como adyuvantes en los protocolos de inmunoterapia contra el cáncer.

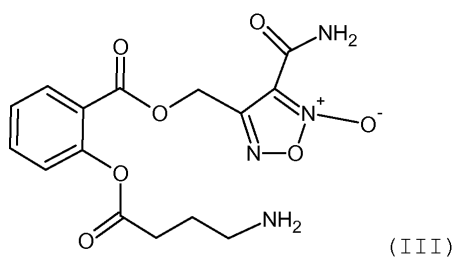
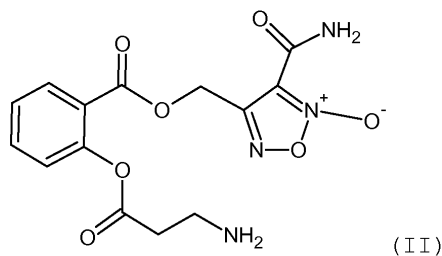
Además, se describen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos según la invención.

Breve descripción de las figuras

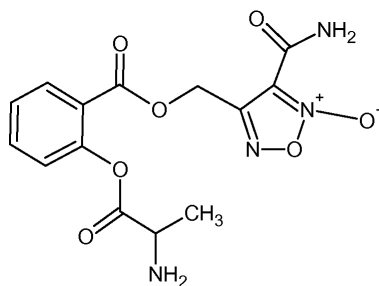
30 La figura 1 representa el esquema de síntesis del compuesto MC526;
 la figura 2 representa el esquema de síntesis del compuesto MC596;
 35 la figura 3 representa el esquema de síntesis del compuesto MC598;
 las figuras 4, 5 y 6 muestran los resultados del ensayo de estabilidad de los compuestos MC526, MC596 y MC598, respectivamente, en suero humano;
 40 la figura 7 muestra los resultados del ensayo de proliferación del compuesto MC526;
 la figura 8 muestra los resultados del ensayo de liberación de cromo.

Descripción detallada de la invención

45 Según un primer objeto, la invención se refiere a los compuestos de N-óxido de 1,2,5-oxadiazol solubles:



50



(IV) .

5 Se usan sales farmacéuticamente aceptables para indicar sales adecuadas para su administración a seres humanos o animales y que tienen propiedades tecnológicas adecuadas, tales como por ejemplo, sal de sodio, potasio, amonio, cinc o cualquier sal con aminoácidos (véase, para referencia general, Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, Mack Pub. Co., N.Y., USA 17^a edición, 1985).

10 Los compuestos de la invención mostraron ventajosamente que eran particularmente solubles en agua y eran particularmente estables en un entorno ácido a un pH de 1-2.

15 En cambio, tienen una semivida corta ($t_{1/2} < 2$ minutos) tras el contacto con suero humano en el que se hidrolizan rápidamente. Por tanto, los compuestos de la invención son particularmente adecuados para su uso como medicamento, en particular para el tratamiento de las patologías correlacionadas con la generación de especies reactivas de nitrógeno (RNS).

Ejemplos de tales patologías comprenden neoplasias, enfermedades inflamatorias o infecciones crónicas.

20 En un aspecto preferido, los compuestos de la presente invención se usan para el tratamiento de cáncer de próstata y, en particular, los compuestos de fórmula (II), (III) y (IV), pueden usarse de manera útil para tal fin. Con respecto a esto, los compuestos mencionados anteriormente pueden formularse, junto con excipientes y aditivos farmacéuticamente aceptables adecuados según la forma farmacéutica seleccionada. En particular, pueden añadirse uno o más de entre diluyentes, disolventes, agentes de carga, modificadores reológicos, estabilizadores, estabilizadores del pH, agentes de unión, tampones, agentes disgregantes, conservantes, agentes elastizantes, emulsionantes, agentes quelantes, agentes lubricantes, edulcorantes, agentes dulcificantes, agentes colorantes y/o agentes aromatizantes.

30 En cuanto a la dosificación del principio activo, representado por un compuesto según la presente invención, ésta puede determinarse según la forma farmacéutica preseleccionada y que puede definirse por el experto en farmacología según el protocolo terapéutico requerido. Según un aspecto adicional, los compuestos descritos pueden usarse como adyuvantes en los protocolos de inmunoterapia contra las patologías correlacionadas con la generación de especies reactivas de nitrógeno y, en particular, del cáncer de próstata.

35 Tales protocolos comprenden la administración de una cantidad farmacológicamente eficaz de compuesto a un paciente, en los que dicha cantidad puede definirse por el experto en tratamiento de inmunoterapia.

Ejemplo 1

40 **Preparación de clorhidrato de 2-(β -alaniloxi)benzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo (compuesto MC526 (II))**

Se preparó el compuesto según el esquema indicado en la figura 1.

45 A una disolución de salicilato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo (0,2 g; 0,716 mmol) y Boc- β -Ala-OH (0,17 g; 0,86 mmol) en CH_2Cl_2 (10 ml) se le han añadido catalizador DMAP y EDC·HCl (0,25 g; 0,86 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante 2 horas.

50 Tras añadir agua, se extrajo la disolución con cloruro de metileno (3 X 10 ml). En primer lugar se lavó la fase orgánica con NaHCO_3 (2 X 20 ml), y luego con salmuera (10 ml), y entonces se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. La evaporación del disolvente a baja presión dio aceite incoloro que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluyente PE/EtOAc 7/3 v/v). Por tanto se obtuvo el 2-{3-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]propanoil}oxi)benzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo puro como un aceite incoloro. Se disolvió el producto en 5 ml de una disolución 2,36 M de ácido clorhídrico en dioxano anhidro y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiental durante dos horas. Se recuperó el residuo obtenido tras la evaporación del disolvente a baja presión con cloruro de metileno (3 X 15 ml) para obtener el producto deseado (II) con un rendimiento del 80% en forma de un sólido blanco.

Se recristalizó el clorhidrato usando etanol absoluto. Punto de fusión: 102-104°C

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,52 (s_a, 1H, -CONH₂); 8,19 (s_a, 2H, NH₂); 8,03-8,00 (m, 1H, Ph); 7,84 (s_a, 1H, -CONH₂); 7,79-7,74 (m, 1H, Ph); 7,47 (t, 1H, Ph); 7,37 (d, 1H, Ph); 5,60 (s, 2H, -OCH₂-Fx); 3,14-3,00 (m, 4H, 2-CH₂).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): δ 169,9; 163,9; 156,5; 155,4; 150,8; 135,8; 132,4; 111,3; 62,9; 58,7; 35,3; 32,4.

Anal. Calc. para C₁₄H₁₅N₄O₇Cl x ½ H₂O % de C 42,49, % de H 4,07, % de N 14,16; hallado % de C 42,25, % de H 3,88, % de N 13,98.

Ejemplo 2

Preparación de clorhidrato de 2-(4-aminobutanoiloxi)benzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo (compuesto MC596 (III))

Se preparó el compuesto según el esquema indicado en la figura 2.

En particular, a una disolución de salicilato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo (0,28 g; 1,00 mmol) y Boc-GABA-OH (0,24 g; 1,20 mmol) en CH₂Cl₂ (20 ml) se le añadieron catalizador MAP y EDC·HCl (0,36 g; 1,20 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante 2 horas.

Entonces se añadió agua y se extrajo la disolución con cloruro de metileno (3 X 10 ml); se lavó la fase orgánica con NaHCO₃ (2 X 20 ml), salmuera (10 ml), se secó con sulfato de magnesio anhidro y se evaporó para dar un aceite incoloro que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con PE/EtOAc 7/3 v/v para dar 2-(4-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]butanoiloxi)benzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo como un aceite incoloro.

Se disolvió el 2-(3-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]butanoiloxi)benzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo en 5 ml de una disolución 2,36 M de ácido clorhídrico en dioxano anhidro y se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante dos horas. Entonces se filtró el precipitado formado y se obtuvo el compuesto en cuestión (III) con un rendimiento del 70% en forma de un sólido blanco. Se recristalizó el producto usando etanol absoluto. Punto de fusión: 190°C con descomposición.

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,45 (s_a, 1H, -CONH₂); 8,09 (s_a, 2H, NH₂); 8,01-7,94 (m, 1H, Ph); 7,82-7,70 (m, 2H, Ph + -ONH₂); 7,44 (t, 1H, Ph); 7,30 (d, 1H, Ph); 5,58 (s, 2H, -OCH₂-Fx); 2,95-2,84 (m, 2H, -CH₂NH₂); 2,74 (t, 2H, -H₂CO-); 1,95 (qi, 2H, -CH₂CH₂-).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): δ 170,9; 162,9; 155,5; 154,4; 150,1; 134,8; 131,4; 126,4; 124,2; 121,9; 110,3; 57,5; 37,8; 30,3; 22,0. Anal. Calc. para C₁₅H₁₇N₄O₇Cl % de C 44,95, % de H 4,28, % de N 13,98; hallado % de C 44,96, % de H 4,28, % de N 13,79.

Ejemplo 3

Preparación de clorhidrato de 2-(alaniloxi)benzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo (compuesto MC598 (IV))

Se preparó el compuesto según el diagrama indicado en la figura 3.

En particular, a una disolución de salicilato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo (0,28 g; 1,00 mmol) y Boc-Ala-OH (0,23 g; 1,20 mmol) en CH₂Cl₂ (20 ml) se le añadieron catalizador DMAP y EDC·HCl (0,36 g; 1,20 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante 2 horas.

Entonces se añadió agua y se extrajo la disolución con cloruro de metileno (3 X 10 ml); se lavó la fase orgánica con NaHCO₃ (2 X 20 ml), salmuera (10 ml), se secó con sulfato de magnesio anhidro y se evaporó para obtener un aceite incoloro que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con PE/EtOAc 7/3 v/v para dar 2-(2-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]propanoiloxi)benzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo como un aceite incoloro.

Se disolvió el 2-(3-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]propanoiloxi)benzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo en 5 ml de una disolución 2,36 M de ácido clorhídrico en dioxano anhidro y se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante dos horas. Entonces, se filtró el precipitado formado y se obtuvo el compuesto en cuestión (IV) con un rendimiento del 60% en forma de un sólido blanco.

Se recristalizó el producto usando etanol absoluto. Punto de fusión: 185°C con descomposición.

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 8,81 (s_a, 2H, -NH₂); 8,54 (s_a, 1H, -CONH₂); 8,05-8,02 (m, 1H, Ph); 7,85-7,78 (m, 2H, Ph +

-ONH₂); 7,55-7,49 (*m*, 1H, Ph); 7,41-7,39 (*m*, 1H, Ph); 5,61 (*s*, 2H, -OCH₂-Fx); 4,42-4,35 (*m*, 1H, -CH); 1,62 (*d*, 3H, -CH₃).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): δ 168,4; 162,7; 155,5; 154,4; 149,1; 135,0; 131,5; 127,1; 123,8; 121,8; 110,3; 62,7; 57,6; 15,4.

Anal. Calc. para C₁₄H₁₅N₄O₇Cl x 0,25 H₂O % de C 42,98, % de H 3,99, % de N 14,32; hallado % de C 42,90, % de H 3,99, % de N 14,30.

Ejemplo 5

Estudios de estabilidad

Se estudió la estabilidad del compuesto MC526 a través de cromatografía de fase inversa en un medio acuoso a pH = 1 y en el suero humano a 37°C.

En particular, se añadió una disolución 10 mM del compuesto del ejemplo 1 en DMSO a una disolución 0,1 M de HCl precalentado hasta 37°C. La concentración final del compuesto era de 100 µM. Se mantuvo la disolución resultante a 37 ± 0,5°C y se analizaron alícuotas de 20 µl de la disolución de reacción por medio de RP-HPLC a intervalos de tiempo adecuados.

Con el fin de someter a ensayo la estabilidad del compuesto del ejemplo 1 en suero humano, se añadió una disolución 10 mM del compuesto en DMSO a suero humano (obtenido de plasma AB humano, Sigma) precalentado hasta 37°C. La concentración final del compuesto era de 200 µM. Se incubó la disolución resultante a 37 ± 0,5°C y se recogieron alícuotas de 300 µl de la mezcla de reacción y se añadieron a una cantidad igual de acetonitrilo que contenía ácido trifluoroacético al 0,1% a intervalos de tiempo adecuados para desproteinizar el suero. Se sonicó la muestra, se agitó con vórtex y luego se centrifugó durante 10 minutos a 2150 g. Se filtró el sobrenadante blanco usando filtros de PTFE de 0,45 µm (Alltech) y se analizó a través de RP-HPLC.

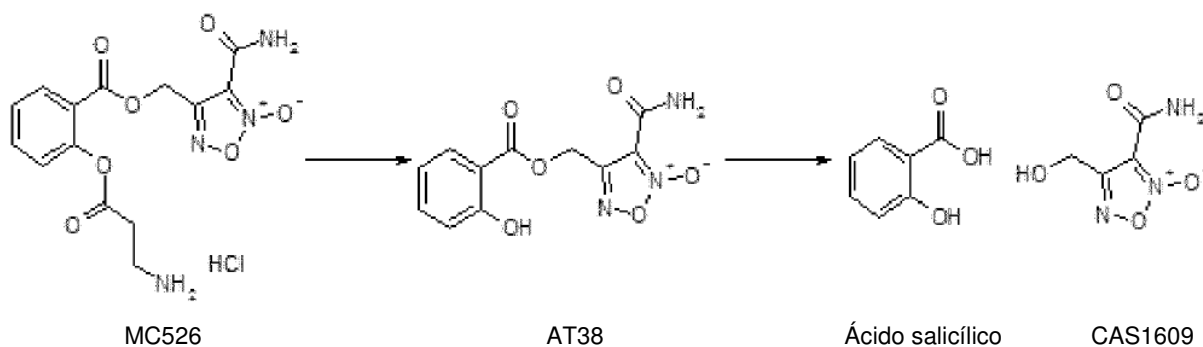
El análisis en RP-HPLC permite separar y cuantificar los compuestos iniciales y los que se derivan de la hidrólisis. Se llevó a cabo el análisis usando un sistema de cromatografía HP1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con una bomba cuaternaria (modelo G1311A), una membrana de desgasificación (G1379A), un detector de red de diodos (DAD) (modelo G1315B) integrado en el sistema HP1100. Se usó un sistema HP ChemStation (Agilent Technologies) para analizar los datos. La columna analítica fue Nucleosil 100-5 C18 Nautilus (250 X 4,6 mm, tamaño de las partículas de 5 µm) (Macherey-Nagel). Se constituyó la fase móvil usada mediante acetonitrilo/agua (55/45) con ácido trifluoroacético al 0,1% y la velocidad de flujo es de 1,2 ml/min. El volumen de inyección fue de 20 µl (Rheodyne, Cotati, CA). Se monitorizó el efluente de la columna a 226 nm (para el compuesto MC526 y para CAS 1609) y a 240 nm (para el ácido salicílico y el salicilato AT38) frente a una referencia a 600 nm. Se llevó a cabo la cuantificación de los productos iniciales y de los que se derivaban de la hidrólisis por medio de curvas de calibración curvas obtenidas usando patrones estudiados en las mismas condiciones (para concentraciones comprendidas entre 5 y 200 µM).

Los compuestos revelaron ser moderadamente estables a pH = 1 (más del 60% del compuesto resultó inalterado tras 1 hora de incubación).

Los resultados de estos ensayos se indican en la siguiente tabla.

COMPUESTO	Estabilidad en tampón a pH = 1 tras 1 hora
MC526	60%
MC596	90%
MC598	80%

Cuando se incuban en suero humano, los compuestos se hidrolizan rápidamente (*t*_{1/2} < 2 minutos) para dar el derivado de salicilato (AT38) que libera lentamente el compuesto CAS 1609 y ácido salicílico según el esquema a continuación que indica la hidrólisis del compuesto MC526.



Los resultados del ensayo de estabilidad en suero humano se indican en la tabla a continuación y en las figuras 4, 5 y 6.

COMPUESTO	Estabilidad en suero humano, $t_{1/2}$ (min)
MC526	1,4
MC596	1,6
MC598	1,3

5 **Ejemplo 6**

Solubilidad

10 La tabla a continuación muestra los datos en cuanto a la solubilidad de los compuestos de la invención y de un compuesto de referencia (AT38).

COMPUESTO	Solubilidad en agua
<p style="text-align: center;">AT38</p>	<1 mg/l
MC526	10 g/l
MC596	2,5 g/l
MC598	10 g/l

15 **MATERIALES Y MÉTODOS**

Líneas celulares y ratones

20 CT26 (H-2d), un carcinoma de colon inducido en BALB/c; MBL-2 (H-2b), con linfoma inducido por virus de Moloney; C26-GM, una línea celular derivada del carcinoma de colon C26 (H-2d) modificada genéticamente para liberar un factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

25 Se hacen crecer las células en DMES (Invitrogen) o en RPMI 160 (Euroclone) complementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM (DMEM) o piruvato de sodio 1 mM (RPMI 1640), 2-mercaptoetanol 20 mM, estreptomycin 150 unidades/ml y penicilina 200 unidades/ml, FBS inactivado por calor al 10% (Invitrogen o BioWhittaker).

Se adquirieron los ratones BALB/c (H-2d) y C57BL/6 (H-2d) (ocho semanas de edad) de Harlan.

30 Se les inoculó a los ratones BALB/c en la cavidad inguinal $0,5 \cdot 10^6$ células C26GM por vía s.c. Se sacrificaron los ratones tras 9 días y se usaron los esplenocitos para ensayos *in vitro*.

Para experimentos *in vivo*, se les inoculó a los ratones BALB/c $0,5 \cdot 10^6$ células C26GM por vía subcutánea en el costado izquierdo.

Ensayo de proliferación

5 Se siembran en placa los esplenocitos de los ratones BALB/C del grupo de animales control y de los animales que portan el carcinoma de colon 26 (C26GM) hasta la concentración de $6 \cdot 10^5$ células por pocillo y se estimulan con $3 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-CD3 (2C11, ATCC) y $2 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-CD28 (clon 37,5, ATCC) tanto con como sin diluciones escalares de los compuestos objeto de la invención. Tras 3 días de incubación, se añade $1 \mu\text{Ci/pocillo}$ ($1 \text{ C1} = 37 \text{ GBq}$) de $^3\text{H-TdR}$ (PerkinElmer) al cultivo durante 18 horas y se monitoriza la adición del mismo mediante centelleo.

10 La figura 7 muestra los resultados obtenidos mediante el ensayo de proliferación. En particular, los controles (Unst) se refieren a células no estimuladas con anticuerpo anti-CD3 ni anti-CD28 y el control (St) a células estimuladas pero libres de fármaco. Puede observarse que las dosis correspondientes a $200 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$ son tóxicas para las células, porque no se observa proliferación ni siquiera en esplenocitos sanos. La dosis de $50 \mu\text{M}$ es parcialmente tóxica en las células sanas, pero permite la recuperación de la supresión en esplenocitos de ratones con tumor. En cambio, las dosificaciones de $25 \mu\text{M}$ y $12,5 \mu\text{M}$ son eficaces y no tóxicas.

15 Ensayo de liberación de cromo

20 Se prepararon dos cultivos celulares diferentes para evaluar la respuesta de CTL. Para el primero, se estimulan los esplenocitos de BALB/c ($6 \cdot 10^5$ células por pocillo) con ($6 \cdot 10^5$ células por pocillo) de esplenocitos de C57BL/6 irradiados con rayos γ en placas planas de 96 pocillos (BD Falcon), tanto con como sin los derivados de la invención con diluciones escalares. Con el fin de lograr inmunosupresiones, se añaden células CD11b⁺ del bazo de ratones que portaban tumores hasta la concentración final del 3% a una mezcla de cultivo de leucocitos. En el segundo, se estimulan los esplenocitos inmunosuprimidos ($6 \cdot 10^5$ células por pocillo) derivados de los ratones que portaban tumores con ($6 \cdot 10^5$ células por pocillo) de esplenocitos de C57BL/6 irradiados con rayos γ en placas planas de 96 pocillos (BD Falcon), tanto con como sin los derivados de la invención con dilución escalar. El porcentaje de células CD11b⁺ presente en el bazo de estos ratones varía desde el 20 hasta el 40%.

30 En ambas condiciones experimentales, tras 5 días de incubación, se sometieron a ensayo los cultivos para verificar la capacidad para eliminar $2 \cdot 10^3$ células diana alogénicas (MBL-2) o singénicas en el ensayo de liberación de ^{51}Cr en 5 horas.

35 Se calculó el porcentaje de lisis específica + de muestras por triplicado tal como sigue: $(\text{cpm experimentales} - \text{cpm espontáneas}) / (\text{cpm máximas} - \text{cpm espontáneas}) \cdot 100$, en la que 30 unidades líticas (30 UL) representan el número de células CTL que eliminan el 30% de las células diana.

40 En la figura 8A, Alo indica el control de la reacción y es equivalente a cero, porque la reacción se realiza en un entorno inmunosuprimido. La curva representa el porcentaje de lisis en 4 diluciones en serie (100, 66, 33, 11) de efectores (linfocitos activados). Tal como puede observarse, las dosificaciones de $200 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$ son tóxicas dada la ausencia de recuperación de la función citotóxica por los linfocitos. Con dosificaciones inferiores con reducción de la eficacia hay una actividad de recuperación comparable a las condiciones de la respuesta de esplenocitos sanos. La figura 8B muestra los resultados en unidades líticas (UL).

Inmunohistoquímica

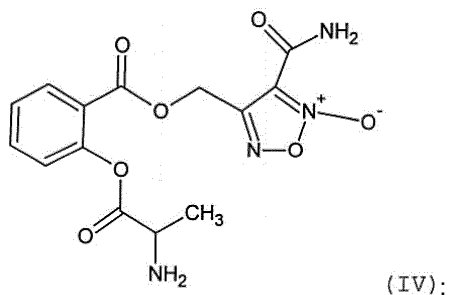
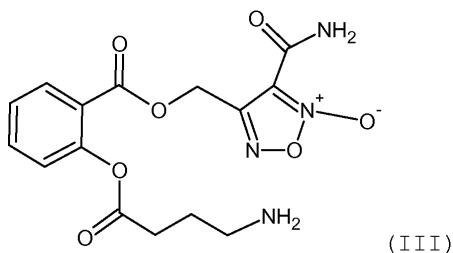
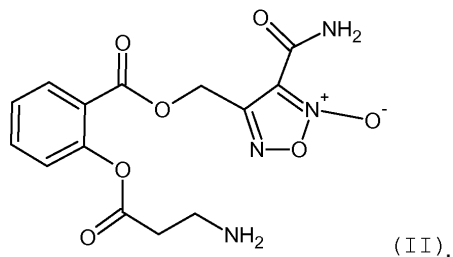
45 Se fijan los tumores en la solución fijadora PLP (periyodato-lisina-paraformaldehído), se crioprotegen en sacarosa al 30% y se congelan en OCT. Se cortan las muestras con un criostato (6 mm) y tras secar al aire, se fijan los cortes con acetona durante 3 minutos. Posteriormente, se rehidratan los cortes con PBS y se bloquean la actividad peroxidasa endógena y los sitios específicos. Se incuban los cortes de tejido con anticuerpos primarios anti-nitrotirosina (a:200, Calbiochem) o anti-CD3 (1:50, Dako) durante 2 horas a temperatura ambiental. Tras lavados con PBS, se incuban las muestras con anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa (Dako) durante 1 hora a temperatura ambiental. Se muestra la inmunorreactividad con 3,3-diaminobencidina (DAB). Se someten los cortes a contratinción con hematoxilina y se montan en Eukitt.

55 Ensayo de citotoxicidad

Se lleva a cabo el ensayo de citotoxicidad para evaluar la eficacia de los compuestos de la invención en el restablecimiento de la actividad citolítica de las células T frente a células diana alogénicas usando dos condiciones inmunosupresoras diferentes.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que tiene la fórmula



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

15 2. Compuesto según la reivindicación 1, para su uso como medicamento.

3. Compuesto según la reivindicación 1, para su uso como medicamento en la terapia de patologías caracterizadas por la generación de especies reactivas de nitrógeno.

20 4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que dichas patologías comprenden neoplasias, enfermedades inflamatorias o infecciones crónicas.

5. Compuesto según la reivindicación 3 ó 4, para su uso en el tratamiento de cáncer de próstata.

25 6. Compuesto según la reivindicación 2, para su uso como adyuvante en los protocolos de inmunoterapia contra neoplasias.

7. Compuesto según la reivindicación 6, en el que tales neoplasias incluyen el cáncer de próstata.

30 8. Composición farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos según la reivindicación 1.

35 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, que comprende excipientes y aditivos seleccionados del grupo que comprende diluyentes, disolventes, agentes de carga, modificadores reológicos, estabilizadores, estabilizadores del pH, agentes de unión, tampones, agentes disgregantes, conservantes, agentes elastizantes, emulsionantes, agentes quelantes, agentes lubricantes, edulcorantes, agentes dulcificantes, agentes colorantes y agentes aromatizantes; solos o en combinación de los mismos.

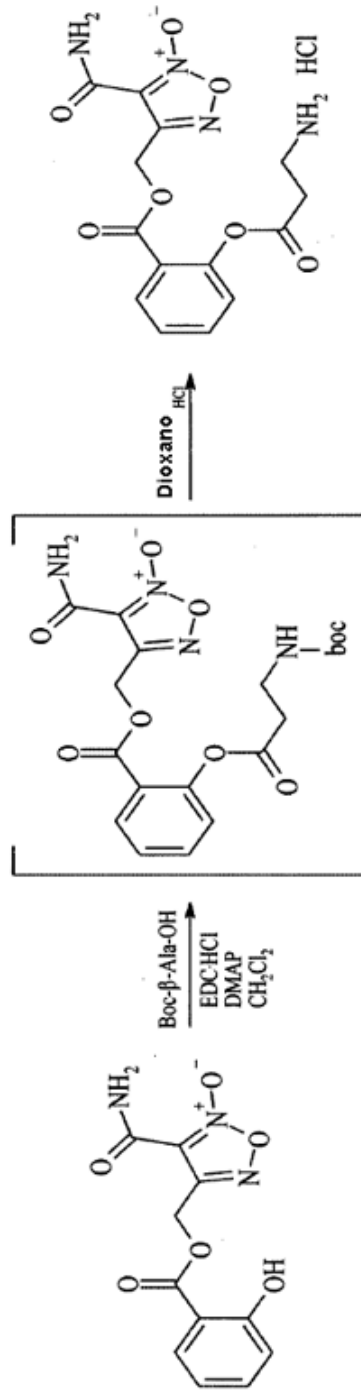


FIG. 1

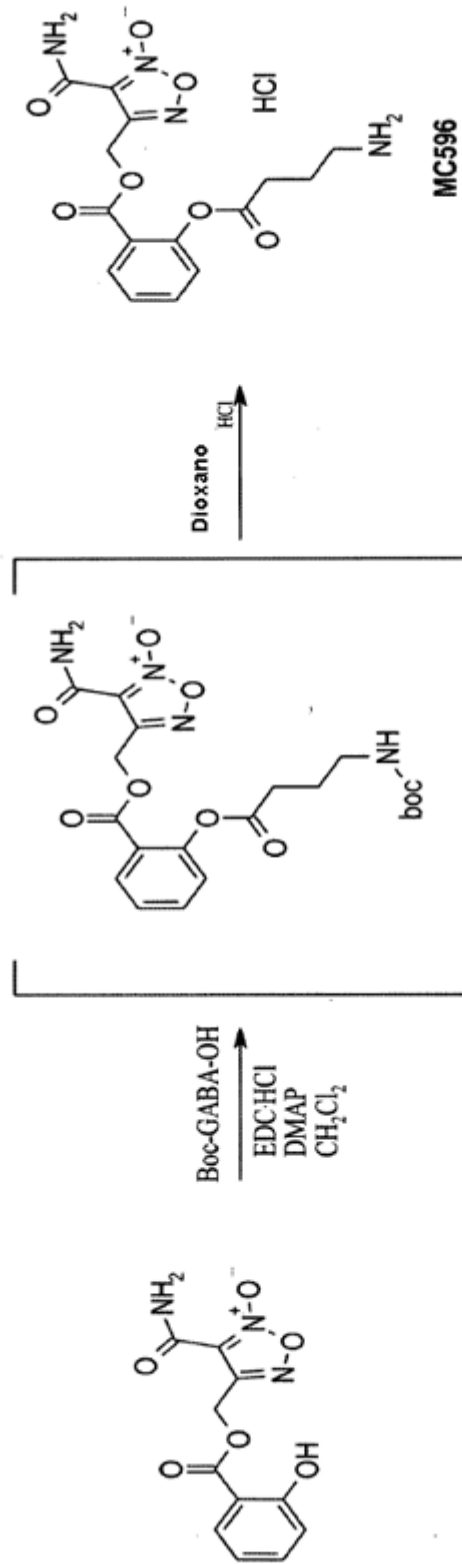


FIG. 2

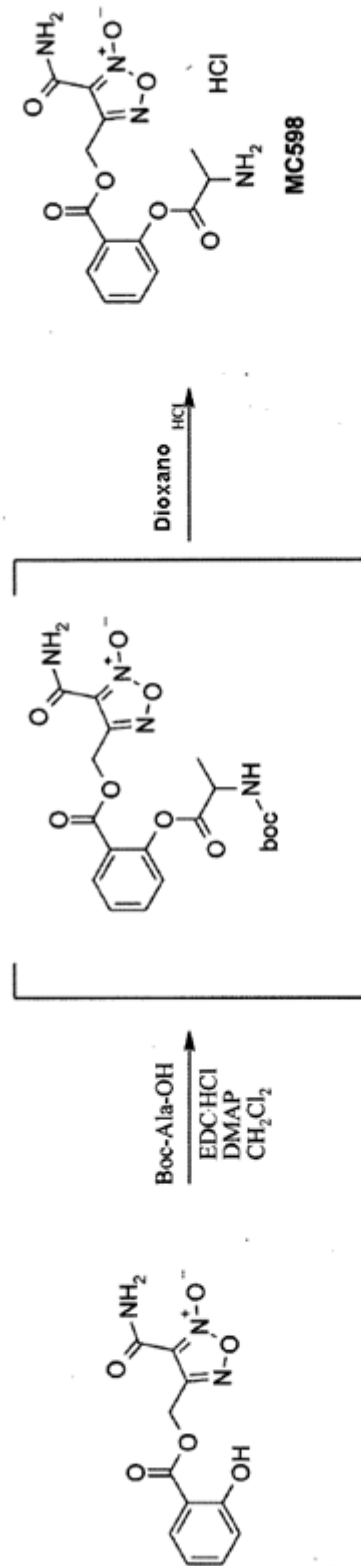


FIG. 3

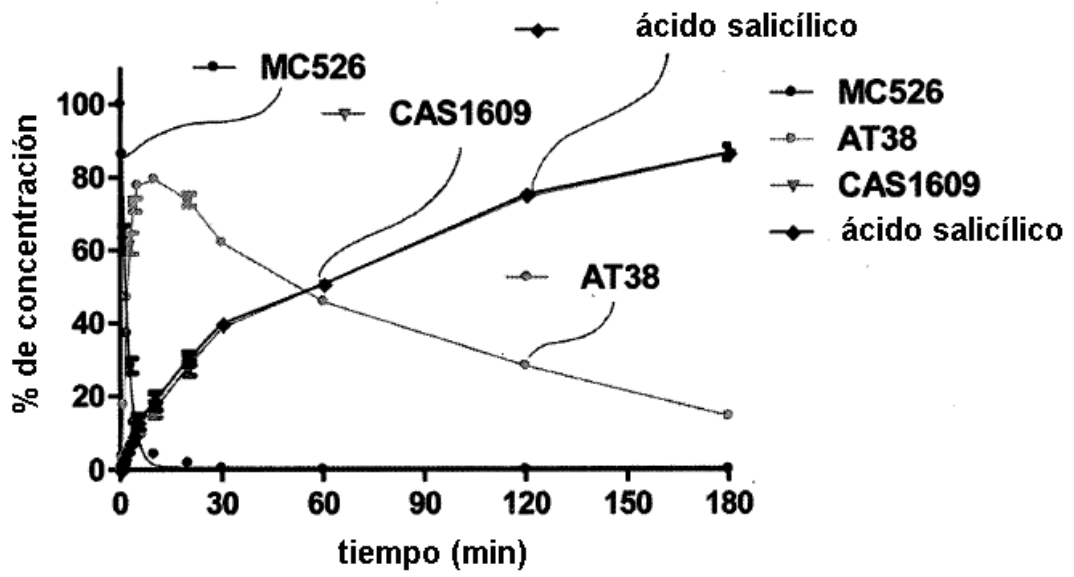


FIG. 4

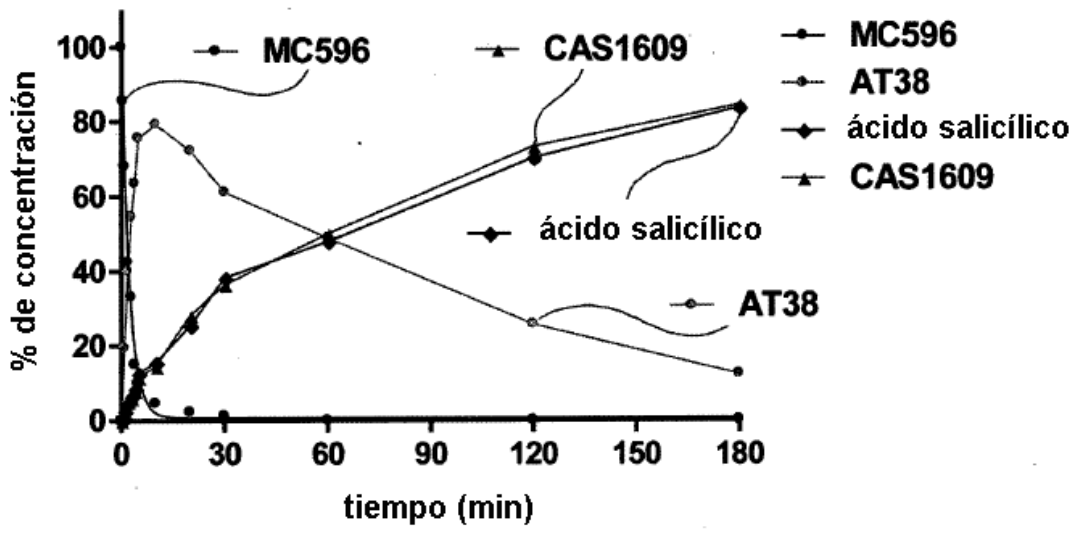


FIG. 5

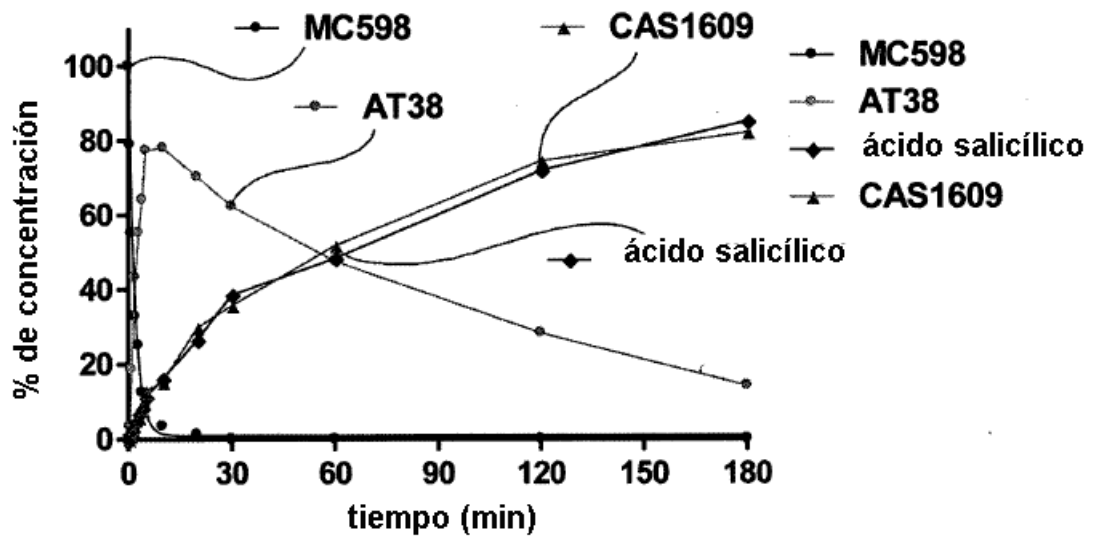


FIG. 6

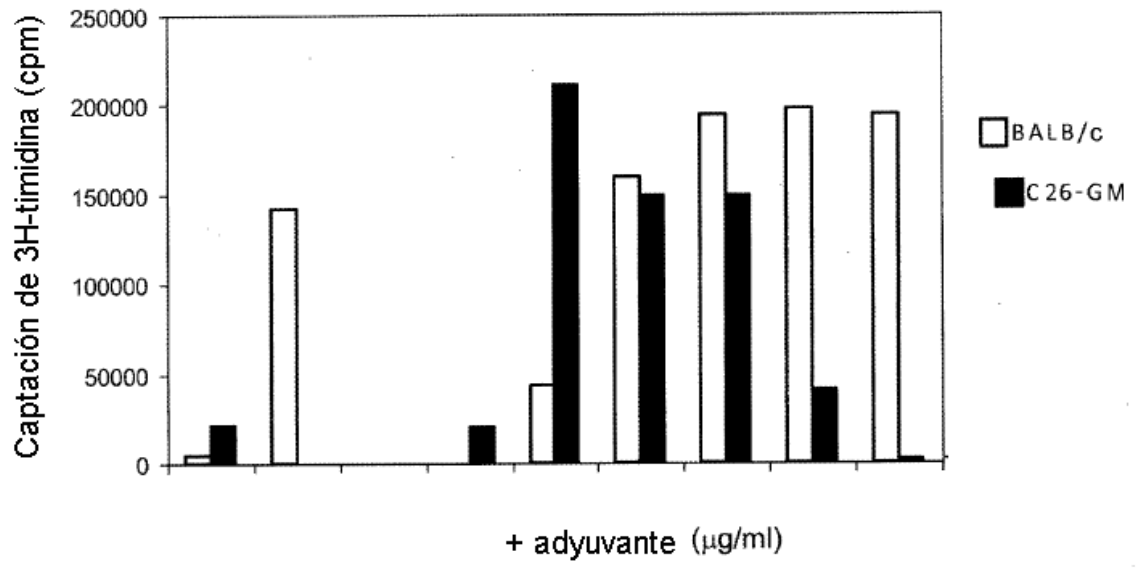


FIG. 7

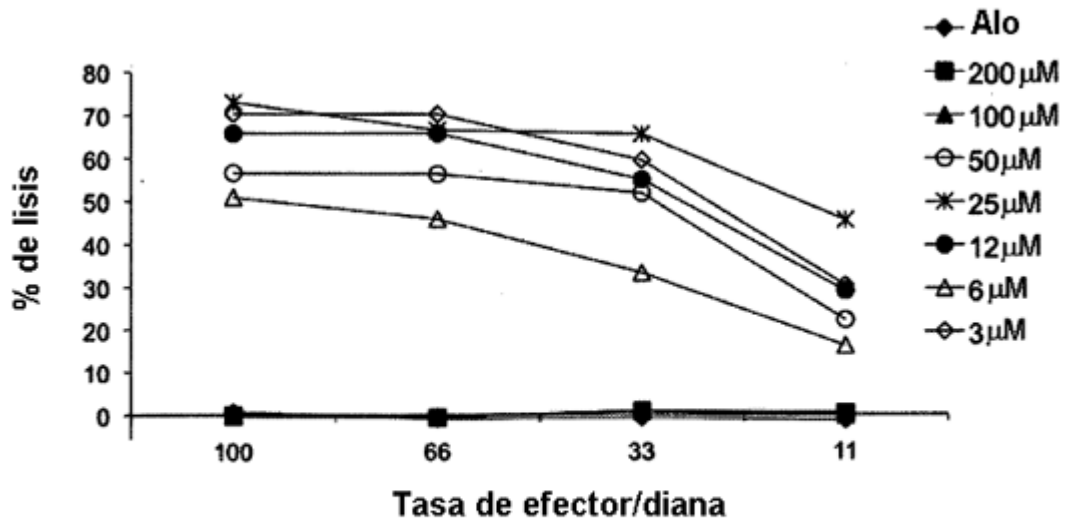


FIG. 8A

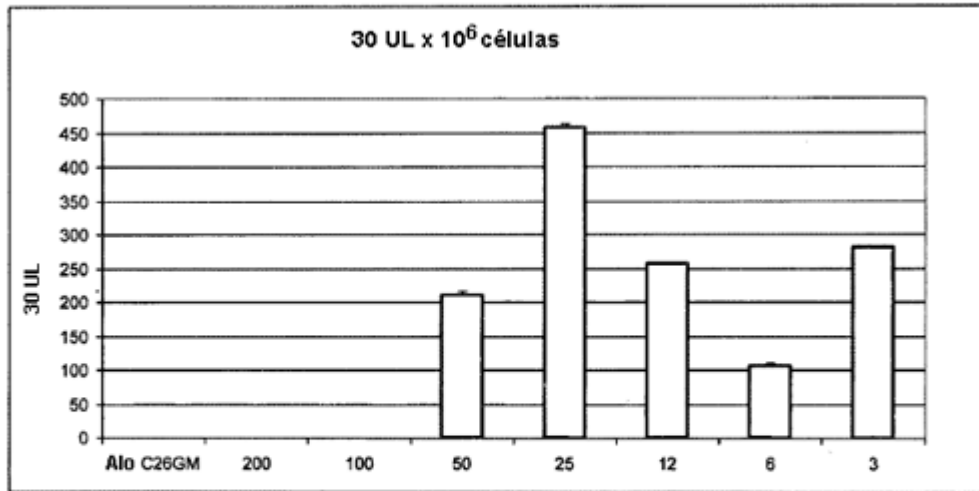


FIG. 8B