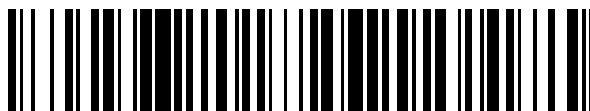


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 136**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2010** **E 10702454 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015** **EP 2376461**

54 Título: **Compuestos derivados de furoxano para óxido nítrico dotados de actividad antitumoral**

30 Prioridad:

15.01.2009 WO PCT/EP2009/000206

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

26.06.2015

73 Titular/es:

HUMANITAS MIRASOLE S.P.A. (50.0%)

Via Manzoni, 56

20089 Rozzano, 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 2 539 136 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

Compuestos derivados de furoxano para óxido nítrico dotados de actividad antitumoral

5 **Campo de la invención**

La presente invención está relacionada con el campo de la medicina; en particular, se refiere a nuevos compuestos derivados de furoxano que pueden inhibir algunas rutas metabólicas implicadas en el desarrollo tumoral.

10 **Antecedentes**

El cáncer de próstata es la segunda causa principal de mortalidad relacionada con tumores malignos en hombres en el mundo occidental. Aunque la prostatectomía radical y la radioterapia local son en gran medida satisfactorias para pacientes con cáncer localizado, los tratamientos disponibles para el carcinoma de próstata metastásico (PCa) han demostrado débil eficacia curativa. Por tanto, es necesario encontrar enfoques terapéuticos alternativos para el cáncer de próstata metastásico que no responde a hormonas. La inmunoterapia puede proporcionar una terapia alternativa válida para pacientes con PCa metastásico que no responde a hormonas. El éxito de este enfoque depende de la capacidad de las células T citotóxicas para eliminar células tumorales. Sin embargo, si el entorno del tumor ejerce una acción supresora sobre los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) específicos de antígeno, la inmunoterapia logrará poco éxito, si logra alguno. Por tanto, es primordial entender la biología celular de TIL y la modulación de las respuestas de TIL por el entorno del tumor.

El papel del entorno del tumor de próstata en la modulación de la respuesta de células T se ha analizado con un estudio basado en el uso de cultivos de órganos soportados por matriz de gel de colágeno de PCa humano. La ventaja de usar esta técnica es que el microentorno permanece intacto y que se preservan todos los factores que pueden afectar a las funciones de TIL, tales como interacción célula-célula, interacción soportada por matriz celular y líquido intersticial. Este enfoque innovador para la biología de TIL permitió obtener varios nuevos hallazgos importantes.

En principio, las muestras de PCa con infiltración de TIL son principalmente linfocitos T CD8+ con un fenotipo terminalmente diferenciado, con experiencia antigénica (CD8+ CD45RA+ CD62L-CCR7-), positivos para perforina y por tanto que pueden eliminar células cancerosas; sin embargo, están en estado latente puesto que no expresan marcadores de activación tales como CD25, CD69 y CD137. Además, a diferencia de los linfocitos que responden normalmente en sangre periférica y próstatas libres de tumor, los TIL no se activan localmente por señales potentes que actúan o bien sobre TCR o bien en rutas de señalización posteriores, lo que indica una deficiencia restringida al tumor. Además, cada vez hay más evidencias de que las enzimas arginasa (ARG) y óxido nítrico sintasa (NOS) están sobreexpresadas en PCa en comparación con la próstata hiperplásica, con la interesante observación de que las propias células tumorales más que las células mieloides infiltrantes podrían ser la fuente principal de las enzimas. Los resultados indican que la regulación en estado estacionario del estado latente depende del metabolismo intratumoral potenciado del aminoácido L-arginina (L-Arg), puesto que la simple adición de inhibidores específicos de ARG y NOS fue suficiente para estimular estos CTL, activarlos y comenzar varios acontecimientos que condujeran a polarización de gránulos citolíticos y eliminación de dianas relacionadas. Además, también se ha demostrado la presencia de altos niveles de nitrotirosinas en los TIL, lo que sugiere una producción local de peroxinitritos, posiblemente debido a las actividades de ARG y NOS, puesto que al inhibir la actividad de las enzimas también se logró una nitración de tirosina reducida.

Estos resultados identifican un mecanismo mediante el cual el cáncer de próstata humano induce inmunosupresión *in situ*. Por tanto, un fármaco que controle la generación de especies reactivas de nitrógeno (RNS) podría ser útil para contribuir a los enfoques inmunoterápicos para el tratamiento del cáncer, creando un entorno del tumor favorable para la activación de linfocitos (Bronte *et al.*, 2005).

Los resultados de ensayos clínicos han demostrado que la eficacia de diferentes enfoques inmunoterápicos no es adecuada para una transferencia inmediata y generalizada de este enfoque terapéutico novedoso para pacientes con cáncer. Un concepto nuevo importante es que el metabolismo alterado presente en el microentorno del tumor puede tener un profundo impacto sobre la actividad antitumoral. Teniendo en cuenta los resultados mencionados anteriormente, está claro que los fármacos que controlan la generación de especies reactivas de nitrógeno (RNS) podrían potenciar significativamente el impacto de los enfoques inmunoterápicos para el tratamiento del cáncer. Por consiguiente, la presente invención proporciona nuevos compuestos de furoxano que actúan sobre los mecanismos del desarrollo tumoral.

60 **Sumario de la invención**

Teniendo en cuenta la estricta relación entre las enzimas ARG, NOS y ciclooxigenasa, todas ellas sobreexpresadas en células de cáncer de próstata en comparación con el epitelio de próstata normal, la presente invención se refiere a moléculas pequeñas novedosas que interfieren con rutas metabólicas múltiples e interconectadas. A diferencia de los adyuvantes convencionales, tales como citocinas y activadores de células presentadoras de antígeno, que se

caracterizan por una amplia acción sobre el sistema inmunitario, falta de selectividad y efectos secundarios potencialmente importantes, las moléculas de la presente invención potencian la función de linfocitos antitumorales efectores o bien presentes de manera espontánea, provocados en pacientes tras vacunación, o bien inyectados a través de un protocolo de inmunoterapia adoptiva.

5

Objeto de la invención

En un primer objeto, la presente invención se refiere a N-óxidos de 1,2,5-oxadiazol según la reivindicación 1.

10 En una segunda realización, la presente invención se refiere a los compuestos de la invención para su uso como medicamento según la reivindicación 2 y, como realización preferida, a su uso como medicamentos para la terapia de patologías caracterizadas por la generación de especies reactivas de nitrógeno, según la reivindicación 3 y 4.

15 Como realización preferida, son para su uso para el tratamiento del cáncer de próstata, según la reivindicación 5.

Como tercera realización, la invención se refiere a una preparación farmacéutica que comprende los compuestos de la invención, según las reivindicaciones 7 y 8.

20 En una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de los compuestos de la invención como adyuvante en los protocolos inmunoterápicos contra el cáncer según la reivindicación 6.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra los resultados del ensayo de proliferación.

25

La figura 2 muestra los resultados del ensayo de cromo.

La figura 3 muestra un gráfico del análisis inmunohistoquímico.

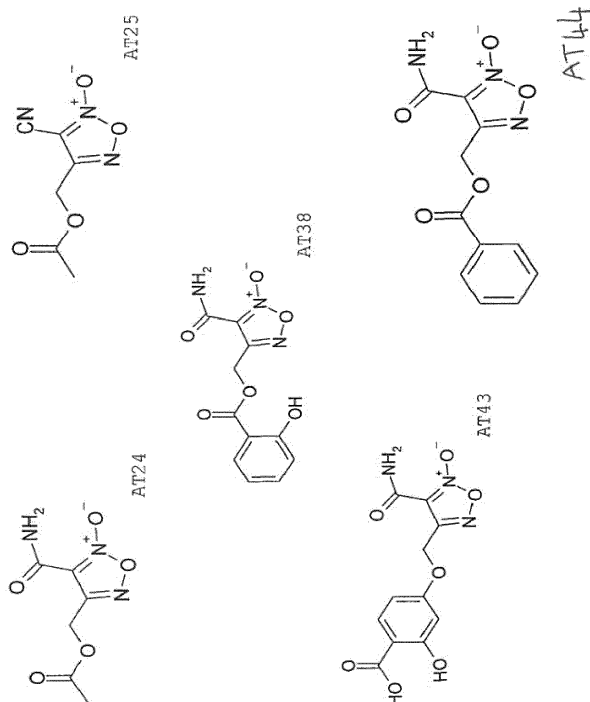
30 La figura 4 muestra los resultados de los experimentos *in vivo* sobre el compuesto AT38.

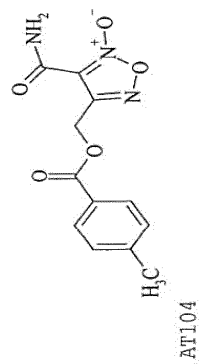
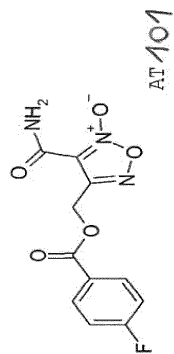
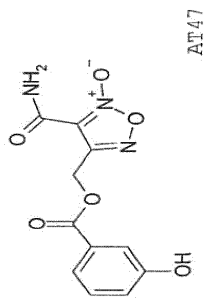
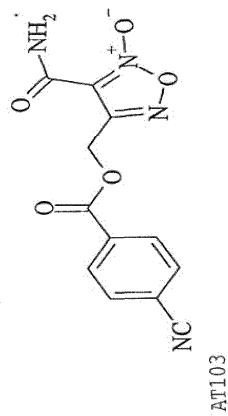
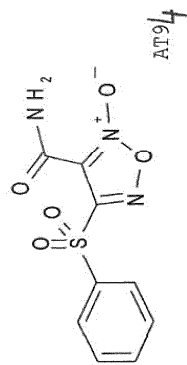
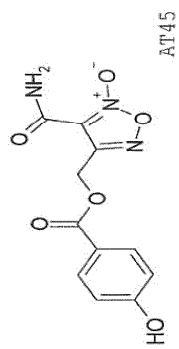
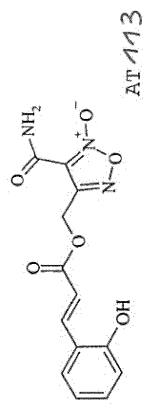
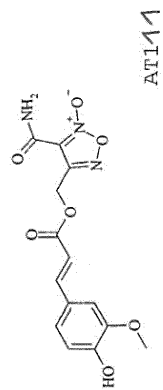
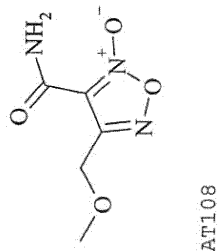
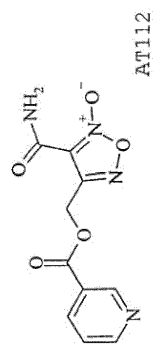
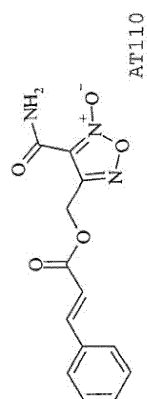
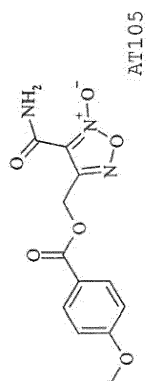
Descripción detallada de la invención

En una primera realización, la presente invención se refiere a nuevos compuestos de furoxano.

35

En particular, los compuestos de la invención son los de las fórmulas siguientes:





SÍNTESIS DE COMPUESTOS SELECCIONADOS DE LA INVENCIONProcedimiento general para la preparación de ésteres benzoicos de 4-(hidroximetil)furoxan-3-carboxamida.

- 5 A una suspensión con agitación de KF (3 mmol) y 4-(bromometil)furoxan-3-carboxamida (1 mmol) en DMF seca (10 ml), se le añadió el ácido benzoico apropiado (1 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a TA durante 1 h.

Entonces se añadió agua (30 ml) y se extrajo la mezcla resultante con EtOAc (3 x 10 ml). Se lavaron las fase orgánicas combinadas con disolución de NaHCO₃ al 10% (2 x 10 ml), salmuera (1 x 10 ml) y luego se secaron sobre
 10 MgSO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida para dar un sólido blanco que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida usando los eluyentes notificados.

Se obtuvieron muestras analíticas mediante cristalización con disolventes apropiados.

- 15 1) Benzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo

Eluyente: PE 7 / EtOAc 3; rendimiento: 80%.

P.f.: 163-165°C (H₂O / iPrOH).

20 ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ, 8,51 (s_a, 1H, -CONH₂); 8,01 (d, 2H, Ph); 7,82 (s_a, 1H, -CONH₂); 7,70 (t, 1H, Ph); 7,56 (t, 2H, Ph); 5,63 (s, 2H, -OCH₂-Fx).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): δ, 164,9; 155,6; 154,7; 133,7; 129,2; 128,9; 128,7; 110,3; 57,4.

25 Masa (CI) (m/z): 264 [MH⁺].

Anal. Calc. para C₁₁H₉N₃O₅ C% 50,19, H% 3,45, N% 15,96; encontrado C% 50,44, H% 3,58, N% 16,04.

- 30 2) Salicilato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo

Eluyente: CH₂Cl₂ 8 / EtOAc 2; rendimiento: 80%.

P.f.: 176-177°C (H₂O / iPrOH).

35 ¹H-RMN (CDCl₃): δ, 8,51 (s_a, 1H, -CONH₂); 7,86 (d, 1H, Ph); 7,59 (s_a, 1H, -CONH₂); 7,53 (t, 1H, Ph); 6,95 (m, 2H, Ph); 5,70 (s, 2H, -OCH₂-Fx).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): δ, 167,0; 159,8; 155,6; 154,0; 135,8; 130,2; 119,2; 117,6; 112,7; 110,4; 57,5.

40 Masa (CI) (m/z): 280 [MH⁺].

Anal. Calc. para C₁₁H₉N₃O₆ C% 47,32, H% 3,25, N% 15,05; encontrado C% 47,36, H% 3,58, N% 14,97.

- 45 3) 3-Hidroxibenzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo

Eluyente: CH₂Cl₂ 8 / EtOAc 2; rendimiento: 82%.

P.f.: 203-204°C (H₂O / iPrOH).

50 ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ, 9,91 (s, 1H, Ph-OH); 8,51 (s_a, 1H, -CONH₂); 7,83 (s_a, 1H, -CONH₂); 7,46-7,31 (m, 3H, Ph); 7,09-7,06 (m, 1H, Ph); 5,61 (s, 2H, -OCH₂-Fx).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): δ, 130,6; 165,7; 158,3; 156,4; 155,5; 130,7; 121,6; 120,9; 116,6; 111,2; 60,5.

55 Masa (CI) (m/z): 280 [MH⁺].

Anal. Calc. para C₁₁H₉N₃O₆ C% 47,32, H% 3,25, N% 15,05; encontrado C% 46,97, H% 3,18, N% 15,45.

- 60 4) 4-Hidroxibenzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo

Eluyente: CH₂Cl₂ 8 / CH₃OH 2; rendimiento: 50%.

P.f.: 241-242°C (H₂O / iPrOH).

65

^1H -RMN (DMSO- d_6): δ , 10,44 (s, 1H, Ph-OH); 8,49 (s_a , 1H, -CONH $_2$); 7,85 (d, 2H, Ph); 7,82 (s_a , 1H, -CONH $_2$); 6,87 (d, 2H, Ph); 5,55 (s, 2H, -OCH $_2$ -Fx).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6): δ , 164,7; 162,4; 155,6; 154,9; 131,7; 119,2; 115,4; 110,3; 57,0.

Masa (Cl) (m/z): 280 [MH $^+$].

Anal. Calc. para C $_{11}$ H $_9$ N $_3$ O $_6$ C% 47,32, H% 3,25, N% 15,05; encontrado C% 47,29, H% 3,25, N% 15,17.

5) 4-Fluorobenzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo

Eluyente: CH $_2$ Cl $_2$ 8 / EtOAc 2; rendimiento: 90%.

P.f.: 163-164°C (H $_2$ O / iPrOH).

^1H -RMN (DMSO- d_6): δ , 8,52 (s_a , 1H, -CONH $_2$); 8,08 (*m*, 2H, Ph); 7,83 (s_a , 1H, -CONH $_2$); 7,37 (*t*, 2H, Ph); 5,62 (s, 2H, -OCH $_2$ -Fx).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6): δ , 165,3 (d, J^1_{CF} = 270 Hz); 164,0; 155,6; 154,6; 132,3 (d, J^3_{CF} = 9,75 Hz); 125,3; 116,0 (d, J^2_{CF} = 22,2 Hz); 110,4; 57,6.

Masa (Cl) (m/z): 282 [MH $^+$].

Anal. Calc. para C $_{11}$ H $_8$ N $_3$ O $_5$ F C% 46,98, H% 2,87, N% 14,94; encontrado C% 47,10, H% 2,86, N% 15,00.

6) 4-Nitrobenzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo

Eluyente: CH $_2$ Cl $_2$ 9 / EtOAc 1; rendimiento: 86%.

P.f.: 172-173°C (H $_2$ O / iPrOH).

^1H -RMN (DMSO- d_6): δ , 8,53 (s_a , 1H, -CONH $_2$); 8,28 (d, 2H, Ph); 8,25 (d, 2H, Ph); 7,85 (s_a , 1H, -CONH $_2$); 5,76 (s, 2H, -OCH $_2$ -Fx).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6): δ , 163,5; 155,4; 154,3; 150,4; 134,1; 130,8; 123,9; 110,4; 58,1.

Masa (Cl) (m/z): 309 [MH $^+$].

Anal. Calc. para C $_{11}$ H $_8$ N $_4$ O $_7$ C% 42,87, H% 2,62, N% 18,18; encontrado C% 42,85, H% 2,67, N% 18,05.

7) 4-Cianobenzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo

Eluyente: CH $_2$ Cl $_2$ 9 / EtOAc 1; rendimiento: 87%.

P.f.: 190-191°C (CHCl $_3$ / *n*-Hex).

^1H -RMN (DMSO- d_6): δ , 8,51 (s_a , 1H, -CONH $_2$); 8,15 (d, 2H, Ph); 8,14 (d, 2H, Ph); 7,82 (s_a , 1H, -CONH $_2$); 5,66 (s, 2H, -OCH $_2$ -Fx).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6): δ , 163,7; 155,5; 154,4; 132,9; 132,6; 129,9; 117,9; 115,8; 110,4; 57,9.

Masa (Cl) (m/z): 289 [MH $^+$].

Anal. Calc. para C $_{12}$ H $_8$ N $_4$ O $_5$ C% 50,01, H% 2,79, N% 19,44; encontrado C% 50,13, H% 2,84, N% 19,48.

8) 4-Metilbenzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo

Eluyente: CH $_2$ Cl $_2$ 9,5 / EtOAc 0,5; rendimiento: 68%.

P.f.: 149-150°C (H $_2$ O / iPrOH).

^1H -RMN (DMSO- d_6): δ , 8,51 (s_a , 1H, -CONH $_2$); 7,90 (d, 2H, Ph); 7,84 (s_a , 1H, -CONH $_2$); 7,37 (d, 2H, Ph); 5,61 (s, 2H, -OCH $_2$ -Fx); 2,41 (s, 3H, Ph-CH $_3$).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6): δ , 164,8; 155,5; 154,7; 144,2; 129,4; 129,3; 125,9; 110,3; 96,9; 57,3.

Masa (CI) (m/z): 278 [MH⁺].

Anal. Calc. para C₁₂H₁₁N₃O₅ C% 51,98, H% 3,99, N% 15,16; encontrado C% 52,10, H% 3,99, N% 15,14.

9) 4-Metoxibenzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo

Eluyente: CH₂Cl₂ 9 / EtOAc 1; rendimiento: 95%.

P.f.: 175-176°C (H₂O / iPrOH).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ, 8,50 (s_a, 1H, -CONH₂); 7,94 (d, 2H, Ph); 7,83 (s_a, 1H, -CONH₂); 7,06 (d, 2H, Ph); 5,83 (s, 2H, -OCH₂-Fx); 3,85 (s, 3H, -OCH₃).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): δ, 164,5; 163,5; 155,6; 154,8; 131,5; 120,8; 114,1; 110,3; 57,2; 55,5.

Masa (CI) (m/z): 294 [MH⁺].

Anal. Calc. para C₁₂H₁₁N₃O₆ C% 49,15, H% 3,78, N% 14,33; encontrado C% 49,27, H% 3,79, N% 14,33.

10) 4-Aminobenzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo

Eluyente: CH₂Cl₂ 9 / EtOAc 1; rendimiento: 89%.

P.f.: 206-208°C (H₂O / iPrOH).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ, 8,50 (s_a, 1H, -CONH₂); 7,83 (s_a, 1H, -CONH₂); 7,69 (d, 2H, Ph); 7,59 (d, 2H, Ph); 6,09 (s, 2H, -NH₂); 5,52 (s, 2H, -OCH₂-Fx).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): δ, 164,9; 155,6; 155,2; 153,9; 131,4; 114,4; 112,6; 110,3; 56,6.

Masa (CI) (m/z): 279 [MH⁺].

Anal. Calc. para C₁₁H₁₀N₄O₅ C% 47,48, H% 3,62, N% 20,14; encontrado C% 47,31, H% 3,60, N% 20,20.

11) 4-Clorobenzoato de [3-(aminocarbonil)furoxan-4-il]metilo

Eluyente: CH₂Cl₂ 9 / EtOAc 1; rendimiento: 98%.

P.f.: 171-172°C (n-Hex / iPrOH).

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ, 8,51 (s_a, 1H, -CONH₂); 8,02 (d, 2H, Ph); 7,83 (s_a, 1H, -CONH₂); 7,65 (d, 2H, Ph); 5,63 (s, 2H, -OCH₂-Fx).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): δ, 164,1; 155,5; 154,5; 138,7; 130,8; 129,0; 127,6; 110,4; 57,7.

Masa (CI) (m/z): 298 [MH⁺].

Anal. Calc. para C₁₁H₈N₃O₅Cl C% 44,38, H% 2,71, N% 14,12; encontrado C% 44,32, H% 2,75, N% 14,13.

Se sostiene que el experto en la técnica podrá preparar otros compuestos que se encuentran dentro del alcance de la presente invención sin carga excesiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y ratones

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

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

Los ratones BALB/c (H-2^d) y C57BL/6 (H-2^b) (de 8 semanas de edad) se adquirieron de Harlan.

Se inocularon en los ratones BALB/c por vía s.c. en el pliegue inguinal 0,5 x 10⁶ células C26GM. Se sacrificaron los ratones tras 9 días y se usaron los esplenocitos para el ensayo *in vitro*.

Para los experimentos *in vivo*, se inocularon en los ratones BALB/c por vía s.c. en el costado izquierdo 0,5 x 10⁶ células C26GM.

Ensayo de proliferación

Se sembraron en placa esplenocitos de BALB/c de animales control y de ratones que portaban tumores de carcinoma de colon 26 (C26GM) a 6 x 10⁵ células/pocillo y se estimularon con anticuerpo anti-CD3 (2C11, ATCC) 3 µg/ml y anticuerpo anti-CD28 (clon 37.5, ATCC) 2 µg/ml o bien con o bien sin diluciones a escala de cada derivado de furoxano como adyuvante. Tras 2 días de incubación, se añadió 1 µCi/pocillo (1 Ci=37 GBq) de ³H-TdR (PerkinElmer) a los cultivos durante 18 h, y se midió la incorporación de ³H-TdR mediante recuento de centelleo.

Ensayo de liberación de cromo

Se prepararon dos cultivos celulares diferentes para evaluar la respuesta de CTL. En primer lugar, se estimularon esplenocitos de BALB/c (6 x 10⁵ células/pocillo) con esplenocitos de C57BL/6 irradiados con rayos γ (6 x 10⁵ células/pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo plano (BD Falcon), o bien con o bien sin derivados de furoxano a diluciones a escala. Para obtener inmunosupresión, se añadieron células CD11b⁺ escogidas de los bazo de ratones que portaban tumores a una concentración final del 3% a un cultivo mixto de leucocitos. En segundo lugar, se estimularon los esplenocitos inmunosuprimidos (6 x 10⁵ células/pocillo) derivados de ratones que portaban tumores con esplenocitos de C57BL/6 irradiados con rayos γ (6 x 10⁵ células/pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo plano o bien con o bien sin derivados de furoxano a diluciones a escala. El porcentaje de células CD11b⁺ presentes en el bazo de estos ratones varió desde el 20 hasta el 40%.

En ambas condiciones experimentales, tras 5 días de incubación, se sometieron a prueba los cultivos para determinar la capacidad para eliminar 2 x 10³ células diana alogénicas (MBL-2) o singénicas (CT26) en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 5 h.

Se calculó el porcentaje de lisis específica a partir de muestras por triplicado de la siguiente forma: (cpm experimentales – cpm espontáneas) / (cpm máximas – cpm espontáneas) x 100, mientras que la unidad lítica 30 (UL30) representa el número de células CTL requeridas para eliminar el 30% de las células diana.

Inmunohistoquímica

Se fijaron los tumores en disolución de fijación de PLP (Paraformaldehído/Lisina/Peryodato), se crioprotegieron en sacarosa al 30% y se congelaron en OCT. Se cortaron las muestras con un criostato (6 mm) y tras secar al aire, se fijaron las secciones con acetona durante 3 min. Posteriormente, se rehidrataron los portaobjetos con PBS y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena y los sitios específicos. Se incubaron las secciones tisulares con anticuerpos primarios anti-nitrotirosina (1:200, Calbiochem) o anti-CD3 (1:50, Dako) durante 2 h a t.a. Tras lavados con PBS, se incubaron las muestras con anticuerpo de cabra anti-peroxidasa de conejo (Dako) durante 1 h a t.a. Se visualizó la inmunorreactividad con 3,3-diaminobencidina (DAB). Se contratiñeron secciones con hematoxilina y se montaron en Eukitt.

Terapia celular adoptiva

Se realizó terapia celular adoptiva (ACT) tras la inoculación de ratones C57BL/6 con 10⁵ células tumorales EG-7 por vía subcutánea en el día 0. Se permitió que los tumores crecieran y se comenzó el tratamiento con fármaco en el día 6. Se dividieron los ratones en 5 grupos: control de crecimiento tumoral (que recibieron sólo carboximetilcelulosa); transferencia adoptiva de CTL específicos de antígeno tumoral; AT38 solo; programa 1 (se trataron los ratones de manera continua tras el día 6 hasta el sacrificio) junto con transferencia adoptiva; programa 2 (se suspendió el fármaco el día tras la transferencia de células) y transferencia de células adoptiva. Los ratones tratados recibieron AT38 a 30 mg/kg/día dividido en 2 dosis de 15 mg/kg cada 12 horas. En el día 10, se inyectaron 5 x 10⁶ CTL específicos de antígeno tumoral por vía i.v. y entonces se trataron los ratones por vía i.p. con 30.000 UI de IL-2 recombinante dos veces al día durante 3 días consecutivos. En el día 14, se sacrificaron los ratones y se tomaron los tumores para el análisis inmunohistoquímico. Se realizó el seguimiento de otros ratones para determinar la supervivencia tal como se muestra en la figura 4.

RESULTADOS

Tabla 1

	Linfoproliferación <i>in vitro</i>	Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i>	
	Intervalo de concentración para rescatar la proliferación de células T (μ M)	Intervalo de concentración para rescatar la actividad citolítica (μ M)	
COMPUESTOS	Bazo de C26GM	B6 + C26GM	B6 + Balb+ 3% de CD11b+
AT24	100-12,5	INEFICAZ	INEFICAZ
AT25	25-6,25	INEFICAZ	aún no probado
AT27	63-13	25	63-32
AT38	72-18	25	72-34
AT43	68	INEFICAZ	68-17
AT44	76-38	INEFICAZ	76
AT45	72-9	100	72
AT47	72-18	50	72-18
AT84	100	50-25	50-25
AT88	19-6,25	1,25 μ g/ml	6,25-3,1
AT94	19-9	INEFICAZ	10-5
AT101	285-142	100-50	aún no probado
AT103	140	100-50	aún no probado
AT104	140	100-50	aún no probado
AT105	273-68	100-50	aún no probado
AT108	1,8 X 10 ³	aún no probado	aún no probado
AT110	200-100	100	aún no probado
AT111	100	100-50	aún no probado
AT112	200	200	aún no probado
AT113	50	100	aún no probado

La tabla 1 anterior notifica una lista parcial de compuestos que se han examinado. La segunda columna de la izquierda notifica la concentración eficaz mínima de cada adyuvante de furoxano requerida para restablecer la proliferación de las células T en la condición de inmunosupresión. Veinte de 95 adyuvantes restablecieron la capacidad de respuesta de los linfocitos T, que se había inhibido por la presencia de células supresoras mieloides.

Se descartaron los adyuvantes que demostraron ser ineficaces en un ensayo de proliferación, mientras que se sometió a prueba el resto en un ensayo de citotoxicidad para evaluar su eficacia en el restablecimiento de la actividad citolítica de las células T contra células diana alogénicas usando dos condiciones inmunosupresoras diferentes (tercera y cuarta columnas de la izquierda).

Nueve de veinte compuestos restablecieron completamente la función citolítica de las células T CD8⁺ en los cultivos alorreactivos que contenían un 3% de células CD11b⁺ inmunosupresoras, uno es ineficaz (cuarta columna).

En condiciones inmunosupresoras fuertes (tercera columna), 14 de 20 compuestos restablecieron la alorreactividad de las células T CD8⁺, mientras que 5 de 20 fueron ineficaces.

La figura 1 muestra los resultados de un ensayo representativo entre los realizados (los resultados para los otros 19 compuestos fueron similares). En particular, puede observarse que el adyuvante usado en este ensayo restableció la capacidad de respuesta de los linfocitos T inhibida por la presencia de células supresoras mieloides. No se observaron efectos tóxicos en cultivos de células control por el derivado de furoxano puesto que la dilución a escala de cada compuesto no afectó a la proliferación de linfocitos de cultivos celulares de BALB/c control (panel izquierdo), mientras que restableció la proliferación en condiciones inmunosupresoras (panel derecho).

La figura 2 representa los resultados de un ensayo de liberación de cromo representativo. Se añadió una única dosis de cada compuesto en el tiempo 0 a los cultivos de células T estimulados con aloantígeno. En el panel superior, las diluciones a escala del derivado de furoxano no afectan a la actividad citolítica de los cultivos celulares de BALB/c control excepto a la dosis superior (200 μ M). En condiciones inmunosupresoras, 100 μ M y 50 μ M de derivado de

furoxano pueden restablecer las funciones citolíticas de las células T CD8⁺ tal como se muestra mediante células UL30/10⁶, lo que es comparable al control. No se observó ningún efecto a concentraciones inferiores. Estos datos son representativos de un compuesto, mostrando los otros 19 resultados similares.

- 5 También se evaluó la solubilidad en vehículos fisiológicos y la estabilidad a pH 2 durante 24 h con el fin de comprender si se podría realizar una administración oral de los adyuvantes.

10 Basándose en los hallazgos, se investigó si el compuesto AT38 podría ser útil en la inmunidad antitumoral provocada por la vacunación contra el cáncer en ratones que portan tumores. Se inyectaron a los animales por vía subcutánea células de carcinoma de colon 26 en el día 0. Se trató a los animales durante nueve días con 3 dosis diferentes de AT38 (10, 30 y 100 mg/kg/día) administradas por vía oral comenzando desde el día 0 (véase la figura 3). En el día 10, se sacrificaron los animales y se extrajeron los tumores para el análisis inmunohistoquímico. En comparación con los controles no tratados, los animales que habían recibido AT38 durante nueve días mostraron una potenciación de los linfocitos T CD3⁺ infiltrantes de tumor y una fuerte reducción de la tinción de nitrotirosina.

15 Según lo anterior, un segundo objeto de la invención son los compuestos de la invención para su uso como medicamento.

20 En una realización preferida, se usan para el tratamiento de patologías caracterizadas por la generación de RNS (especies reactivas de nitrógeno), tales como, por ejemplo, neoplasia, enfermedades inflamatorias o infecciones crónicas.

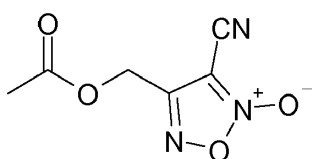
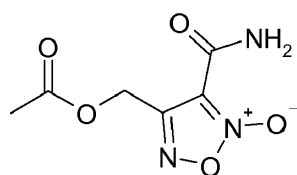
25 Todavía en una realización preferida, los compuestos de la invención pueden usarse para el tratamiento del cáncer de próstata.

Según lo anterior, un tercer objeto de la invención son los compuestos dados a conocer para su uso como adyuvante en los protocolos inmunoterápicos contra las patologías mencionadas anteriormente y, en particular, contra el cáncer maligno.

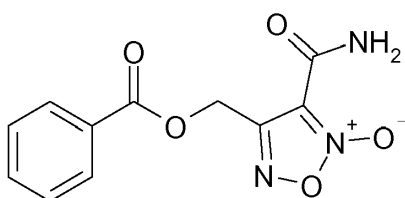
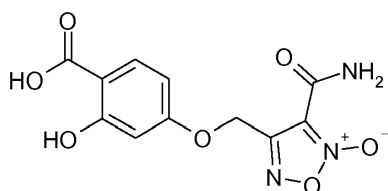
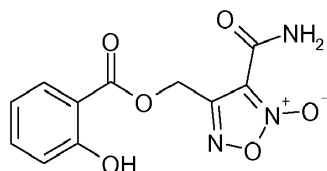
30 Para los fines de la presente invención, los compuestos dados a conocer pueden formularse, junto con excipientes y aditivos seleccionados del grupo que comprende diluyentes, disolventes, agentes de carga, cargas, modificadores reológicos, estabilizadores, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, conservantes, agentes de ajuste del pH, tampones, antioxidantes, agentes quelantes, plastificantes, polímeros, emulsionantes, edulcorantes, agentes aromatizantes; solos o en combinación de los mismos, para dar una preparación farmacéutica según la tercera realización de la invención. En particular, "sal farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquier sal adecuada para administrarse a un ser humano o animal y que tiene propiedades tecnológicas adecuadas, tales como, por ejemplo, una 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., EE.UU., 17^a edición, 1985).

REIVINDICACIONES

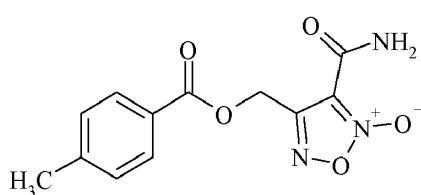
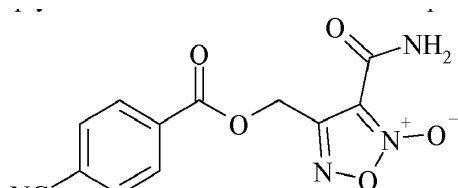
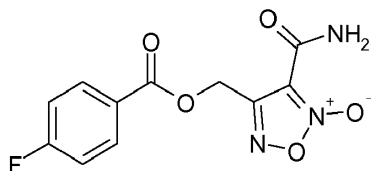
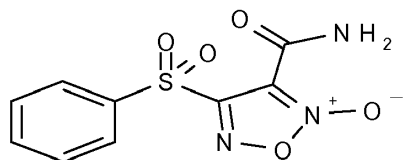
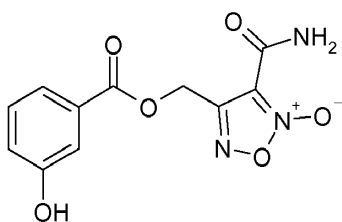
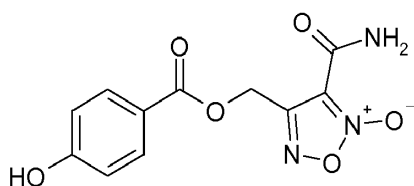
1. Compuestos seleccionados de los siguientes:



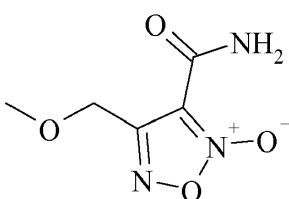
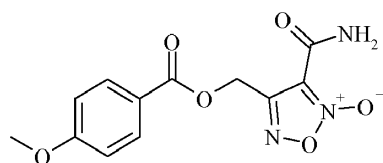
5

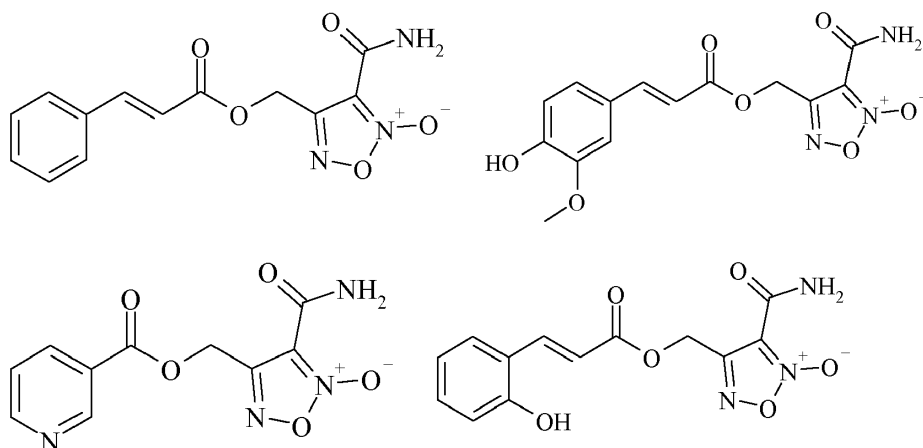


10



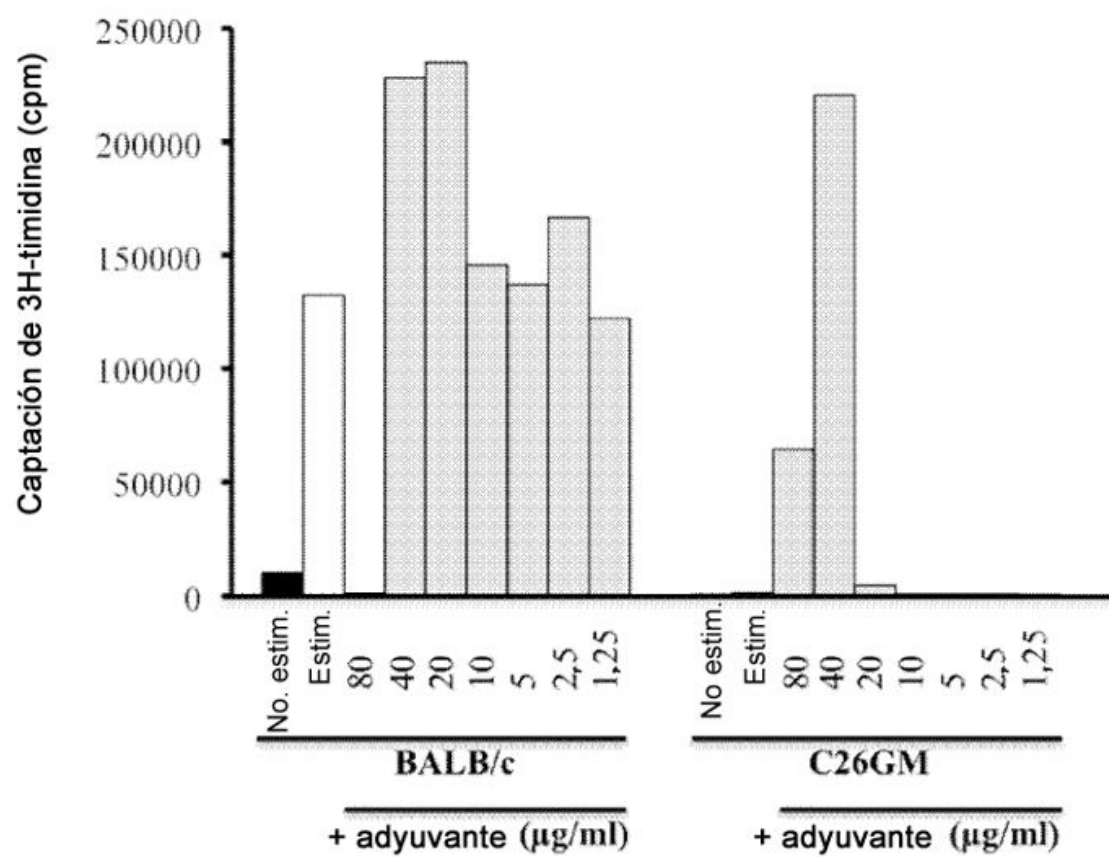
15

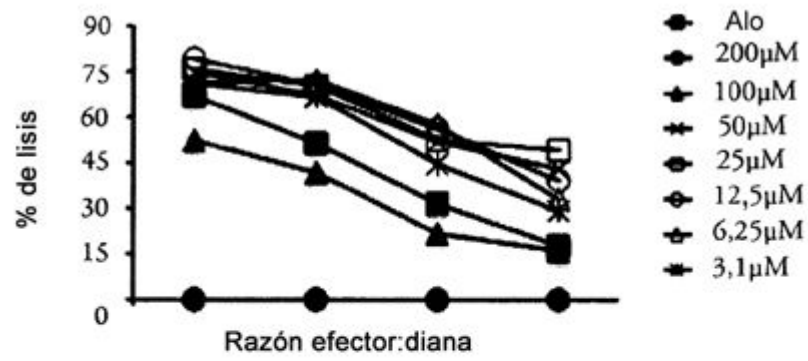




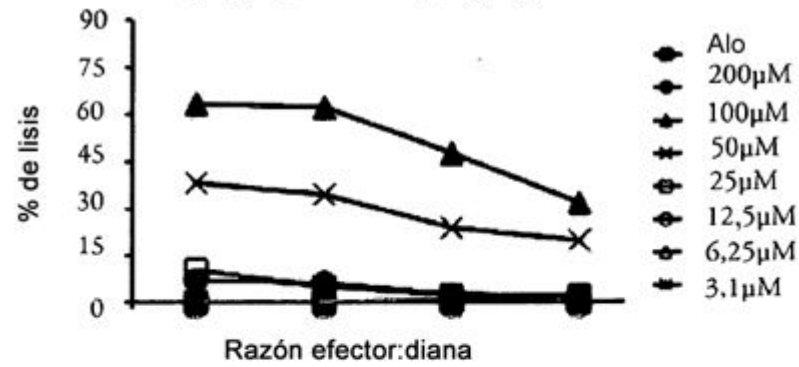
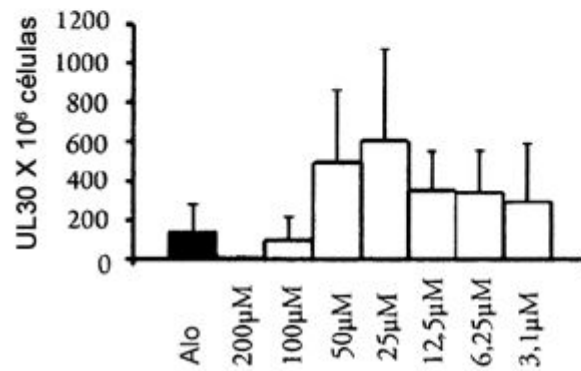
- 5 2. Compuestos según la reivindicación 1, para su uso como medicamento.
3. Compuestos según la reivindicación 1 ó 2, para su uso como medicamento para la terapia de patologías caracterizadas por la generación de especies reactivas de nitrógeno.
- 10 4. Compuestos para su uso según la reivindicación 3, en los que dichas patologías comprenden neoplasia, enfermedades inflamatorias o infecciones crónicas.
5. Compuestos para su uso según la reivindicación 4, para el tratamiento del cáncer de próstata.
- 15 6. Compuestos para su uso según la reivindicación 5, como adyuvante en los protocolos inmunoterápicos contra el cáncer.
7. Preparación farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos según la reivindicación 1.
- 20 8. Preparación farmacéutica según la reivindicación 7, que comprende además excipientes y aditivos seleccionados del grupo que comprende diluyentes, disolventes, agentes de carga, cargas, modificadores reológicos, estabilizadores, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, conservantes, agentes de ajuste del pH, tampones, antioxidantes, agentes quelantes, plastificantes, polímeros, emulsionantes, edulcorantes, agentes aromatizantes; solos o en combinación de los mismos.

FIG. 1





BALB/c



C26GM

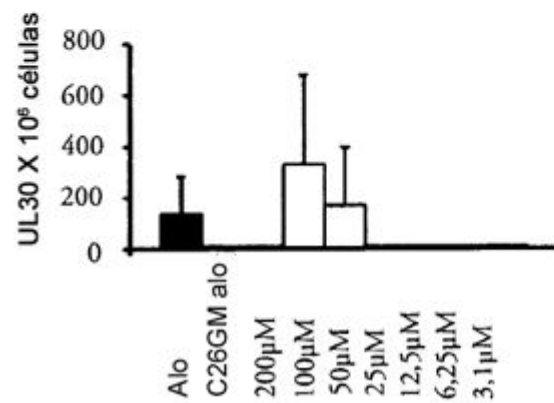


FIG. 2

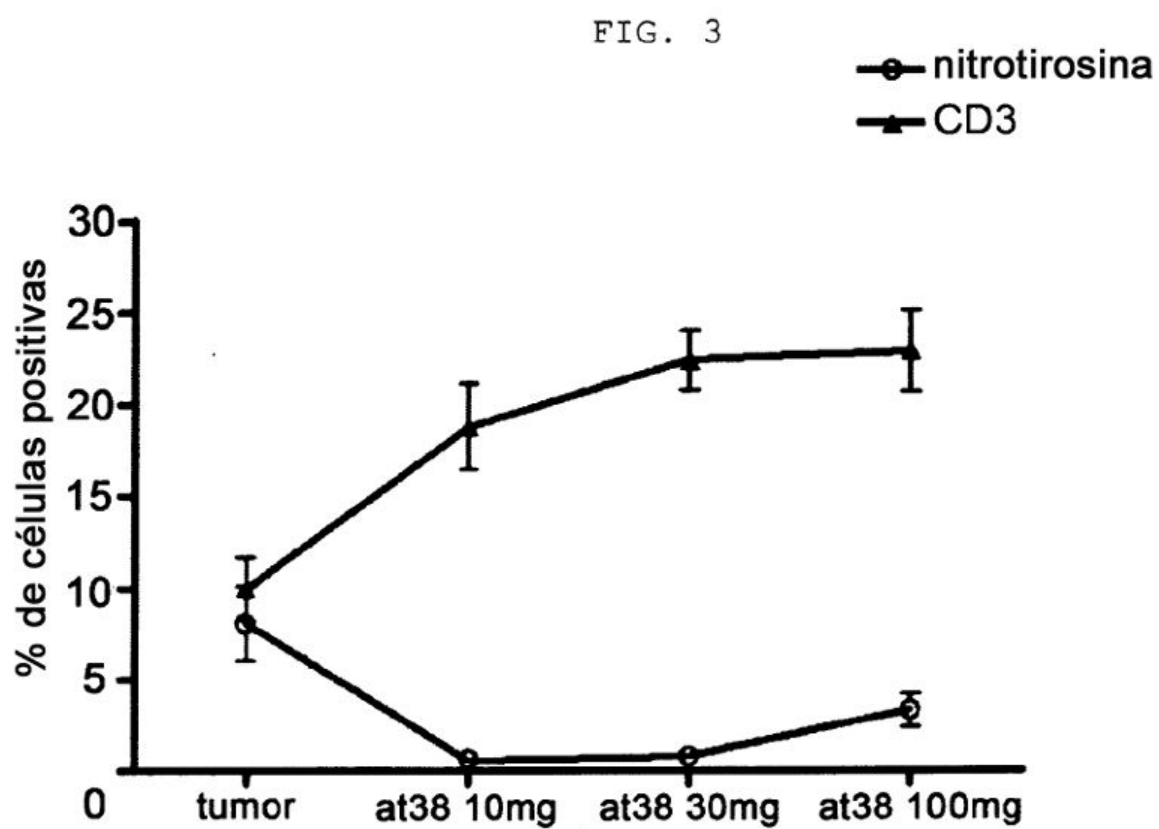


FIG. 4

