

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 215**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/505** (2006.01)

**A61K 31/55** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2008 E 08830619 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2190429**

54 Título: **Un nuevo grupo de inhibidores de la ruta de Stat3 e inhibidores de la ruta de las células madre del cáncer**

30 Prioridad:

**10.09.2007 US 971144 P**

**13.12.2007 US 13372**

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

**09.05.2016**

73 Titular/es:

**BOSTON BIOMEDICAL, INC. (100.0%)**

**640 Memorial Drive  
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**LI, CHIANG JIA;  
JIANG, ZHIWEI;  
ROGOFF, HARRY;  
LI, YOUZHI;  
LIU, JIFENG y  
LI, WEI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 569 215 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

Un nuevo grupo de inhibidores de la ruta de Stat3 e inhibidores de la ruta de las células madre del cáncer

### Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere, en general, al uso de inhibidores de la ruta de Stat3 para tratar trastornos. De modo más específico, la descripción se refiere al uso de inhibidores de la ruta de Stat3 para dirigirse a células madre del cáncer y para tratar otros trastornos. De modo aún más específico, la descripción se refiere al uso de nafto[2,3-b]furan-4,9-diona y otros compuestos relacionados para inhibir a Stat3, para dirigirse a células madre del cáncer y para tratar enfermedades malignas. La descripción también se refiere a un tratamiento para cánceres refractarios, recurrentes o metastásicos, y a procesos para preparar los compuestos pertinentes y sus intermedios, y a una composición farmacéutica de los compuestos pertinentes.

### Antecedentes de la invención

#### *Células madre del cáncer ("cancer stem cells", CSC)*

15 En estos últimos años, un nuevo modelo de tumorigénesis ha conseguido una amplia aceptación, en el que se establece como hipótesis que solo una pequeña fracción de la masa tumoral completa es responsable de las actividades tumorigénicas dentro del tumor, mientras que el antiguo modelo o modelo genético clonal postula que todas las células tumorales mutadas contribuyen por igual a dichas actividades tumorigénicas. Esta pequeña fracción de células tumorigénicas, según el nuevo modelo, son células transformadas con cualidades similares a las células madre y se denominan "células madre del cáncer (CSC). Bonnet y Dick fueron los primeros en demostrar, *in vivo*, la presencia de CSC en la leucemia mieloide aguda (AML) durante los años 90 del pasado siglo. Sus datos demuestran que solo una pequeña subpoblación de células de AML humana tienen la capacidad de transferir la AML cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes, mientras que otras células de AML fueron incapaces de inducir leucemia. Más adelante se demostró que estas CSC tienen los mismos marcadores celulares, CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, que las células madre hematopoyéticas primitivas [1]. Desde entonces, los investigadores han descubierto CSC de modo concluyente en diversos tipos de tumores, que incluyen tumores de cerebro, mama, piel, próstata, etc.

25 El modelo de CSC de la tumorigénesis explicaría por qué es necesario inyectar decenas o centenares de miles de células tumorales en un animal experimental para establecer un trasplante de tumor. En la AML humana, la frecuencia de estas células es menor de 1 en 10.000 [2]. Aunque son infrecuentes dentro de una población concreta de células tumorales, cada vez existen más pruebas de que estas células existen en casi todos los tipos de tumor. Sin embargo, puesto que las líneas de células del cáncer se seleccionan de una subpoblación de células del cáncer que están específicamente adaptadas para crecer en un cultivo de tejidos, las propiedades biológicas y funcionales de las líneas de células del cáncer pueden sufrir cambios drásticos. Por tanto, no todas las líneas de células del cáncer contienen CSC.

35 Las células madre del cáncer comparten muchos rasgos similares con las células madre normales. Por ejemplo, las CSC tienen capacidad de autorrenovación, concretamente, la capacidad para generar otras células madre del cáncer tumorigénicas, generalmente a una velocidad menor que otras células tumorales en división, en oposición a un número limitado de divisiones. Las CSC también tienen la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de células, lo cual explicaría las pruebas histológicas de que no solo muchos tumores contienen múltiples tipos de células nativas al órgano hospedante, sino que también que su heterogeneidad normalmente se mantiene en las metástasis tumorales. Las CSC han demostrado ser fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la reparación del cáncer. Las CSC también se denominan células iniciadores del cáncer, células similares a células madre del cáncer, células del cáncer similares a células madre, células altamente tumorigénicas, células madre de tumores, células madre de tumores sólidos o células supermalignas.

45 La existencia de células madre del cáncer tiene implicaciones fundamentales en los futuros tratamientos y terapias contra el cáncer. Estas implicaciones se manifiestan en la identificación de la enfermedad, un transporte dirigido selectivo del fármaco, la prevención de la recurrencia y la metástasis del cáncer, y el desarrollo de nuevas estrategias en la lucha contra el cáncer.

50 La eficacia de los actuales tratamientos del cáncer a menudo se mide, en los estadios iniciales de ensayo, mediante el tamaño del encogimiento del tumor, es decir, la cantidad de masa tumoral que muere. Puesto que las CSC constituyen una proporción muy pequeña del tumor y tienen unas características biológicas muy diferentes de sus progenies más diferenciadas, la medición de la masa tumoral no refleja necesariamente los fármacos que actúan de modo específico sobre las células madre. De hecho, las células madre del cáncer parecen ser resistentes a la radioterapia (XRT) y también son refractarias a los fármacos quimioterapéuticos y de transporte dirigido [3-5]. Las células madre somáticas normales son naturalmente resistentes a agentes quimioterapéuticos: presentan diversas bombas (tales como MDR) que bombean los fármacos hacia el exterior, y presentan proteínas de reparación del ADN. Además, también presentan una velocidad lenta de recambio celular, mientras que los agentes quimioterapéuticos se dirigen a células de replicación rápida. Las células madre del cáncer, puesto que son los homólogos mutados de las células madre normales, también pueden tener mecanismos similares que las permitan sobrevivir a las terapias con fármacos y al tratamiento con radiación. En otras palabras, las quimioterapias y

radioterapias convencionales destruyen a las células diferenciadas o en diferenciación, que forman la mayor parte del tumor y son incapaces de generar nuevas células madre del cáncer altamente tumorigénicas. Por otra parte, la población de células madre del cáncer que genera las células diferenciadas y en diferenciación pueden permanecer intactas y provocar una recaída de la enfermedad. Otro peligro con respecto a la terapia anticáncer convencional es la posibilidad de que el tratamiento quimioterapéutico deje solo a las células madre del cáncer resistentes a la quimioterapia, y es probable que el consiguiente tumor recurrente también sea resistente a la quimioterapia.

Puesto que las células madre del cáncer supervivientes pueden repoblar el tumor y provocar una recaída, es imprescindible que las terapias anticáncer incluyan estrategias contra las CSC (véase la figura 1). Esto resulta similar a eliminar las raíces para evitar que los dientes de león vuelva a crecer aunque se haya cortado la masa de las hierbas a nivel del suelo [6]. Mediante el ataque selectivo a las células madre del cáncer se pueden tratar pacientes con tumores agresivos inoperables y cánceres refractarios o recurrentes, así como prevenir la recurrencia y la metástasis tumoral. El desarrollo de terapias específicas que se dirigen a las células madre del cáncer puede mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con cáncer, en especial los que padecen cánceres metastásicos. La clave para utilizar este potencial sin explotar es la identificación y la validación de rutas que sean selectivamente importantes para la supervivencia y la autorrenovación de las células madre del cáncer. Por desgracia, aunque en el pasado se han elucidado múltiples rutas que subyacen a la tumorigénesis del cáncer o la autorrenovación en células madre embrionarias y de adulto, no se han identificado y validado rutas para la autorrenovación y la supervivencia de las células madre del cáncer.

También se han realizado muchas investigaciones dirigidas a la identificación y el aislamiento de células madre del cáncer. Los métodos empleados principalmente aprovechan la capacidad de las CSC para efluir fármacos, o se basan en la expresión de marcadores de la superficie asociados con las células madre del cáncer.

Por ejemplo, puesto que las CSC son resistentes a muchos agentes quimioterapéuticos, no resulta sorprendente que las CSC sobreexpresen, de modo casi ubicuo, bombas de eflujo de fármacos, tales como ABCG2 (BCRP-1) [7-11], y otros miembros de la superfamilia del módulo de unión a ATP (ABC) [12, 13]. Por consiguiente, la técnica de las células satélite ("side population", SP), que originariamente se empleó para enriquecer en células madre hematopoyéticas y leucémicas, también se ha empleado para identificar y aislar CSC [14]. Esta técnica, descrita por primera vez por Goodell *et al.*, aprovecha el eflujo dependiente del transportador de ABC diferencial de tintes fluorescentes, tales como Hoechst 33342, para definir y aislar una población celular enriquecida en CSC [10, 15]. De modo específico, las SP se revelan bloqueando el eflujo del fármaco con verapamilo, en cuyo momento los tintes ya no pueden ser expulsados de las SP.

Los investigadores también se han centrado en descubrir marcadores específicos que distinguen a las células madre del cáncer de la masa del tumor. Los marcadores de la superficie que son expresados con más frecuencia por las células madre del cáncer incluyen CD44, CD133 y CD166 [16-22]. La clasificación de las células tumorales basándose principalmente en la expresión diferencial de estos marcadores de la superficie ha sido responsable de la mayoría de las CSC altamente tumorigénicas descritas hasta la fecha. Por tanto, estos marcadores de la superficie están correctamente validados para la identificación y el aislamiento de células madre del cáncer procedentes de líneas celulares de cáncer y de la masa de los tejidos tumorales.

### **Ruta de Stat3**

Existen muchos defectos genéticos diferentes en células de cáncer humano o de mamífero, y muchos se han estudiado en la búsqueda de una cura para el cáncer. Por ejemplo, se ha descubierto que el supresor tumoral p53 es defectuoso o está ausente en más de la mitad de los cánceres humanos. La familia de proteínas STAT ("Signal Transducers and Activator of Transcription", transductores de señales y activadores de la transcripción) son factores de la transcripción latentes que se activan en respuesta a citoquinas/factores del crecimiento para estimular la proliferación, la supervivencia y otros procesos biológicos. Entre estos, Stat3 es activado por la fosforilación de un resto tirosina crítico mediada por tirosina quinasas del receptor del factor del crecimiento, quinasas Jano o las quinasas de la familia Src, etc. Estas quinasas incluyen, pero no se limitan a EGFR, JAK, Abl, KDR, c-Met, Src, y Her2 [23]. Después de la fosforilación de la tirosina, Stat3 forma homodímeros, se transloca al núcleo, se une a elementos de respuesta al ADN específicos en las regiones de promotores de los genes diana, e induce la expresión génica [24].

En las células normales, la activación de Stat3 es transitoria y está fuertemente regulada, y dura de 30 minutos a varias horas. Sin embargo, se ha descubierto que Stat3 permanece aberrantemente activa en una amplia diversidad de cánceres humanos, que incluyen todos los carcinomas principales, así como algunos tumores hematológicos. Stat3 desempeña múltiples papeles en el avance del cáncer. Como es un potente regulador de la transcripción, se dirige a genes implicados en muchas funciones celulares importantes, tales como Bcl-xl, c-Myc, ciclina D1, Vegf, MMP-2, y survivina [25-30]. También es un regulador negativo clave de la vigilancia inmunológica del tumor y del reclutamiento de células inmunológicas [31-33].

La ablación de la señalización de Stat3 mediante ARNsi antisentido, una forma dominante negativa de Stat3 y/o el bloqueo de las tirosina quinasas inhibe ciertas líneas celulares de cáncer o tumores *in vitro* y/o *in vivo* [24, 26, 34, 35]. Pero no se ha establecido, de modo empírico, una conexión clara entre Stat3 y la funcionalidad de las células

madre del cáncer. Los investigadores tampoco han descubierto un inhibidor de la ruta de Stat3 eficaz para explorar los usos terapéuticos potenciales con respecto a los cánceres en los que se ha descubierto la existencia de células madre del cáncer. Tal como se describió anteriormente, las células madre del cáncer (CSC) recientemente han demostrado ser fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis y la reaparición, y deben tomarse en cuenta cuando se diseñe cualquier terapia curativa que se dirija a un tumor en el que se han descubierto estas células, sin tener en cuenta el pequeño tamaño de la fracción que constituyen dentro de la masa tumoral.

En otras enfermedades distintas del cáncer se ha demostrado la sobreactivación de Stat3 por la interleuquina 6 (IL6) en una serie de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias [36]. En fechas recientes, se ha demostrado que la ruta de Stat3 también estimula respuestas inmunológicas patológicas a través de su papel fundamental en la generación de respuestas de células T TH17 [37]. Además, se ha descubierto que la inflamación mediada por la ruta de Stat3-IL6 es el origen causal común para la aterosclerosis, la enfermedad vascular periférica, la enfermedad de la arteria coronaria, la hipertensión, la osteoporosis, la diabetes de tipo 2 y la demencia.

## Sumario

La presente invención se basa, en parte, en las pruebas empíricas proporcionadas en la presente de que Stat3 desempeña un papel clave en la capacidad de supervivencia y de autorrenovación de las células madre del cáncer (CSC) a lo largo de un amplio espectro de cánceres. Por consiguiente, un primer aspecto de la descripción se dirige a un método para inhibir una célula madre del cáncer, en el que dicho método comprende inhibir al menos una parte, la mayoría o sustancialmente toda (por ejemplo, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95%) de la actividad de la ruta de Stat3 en una célula pluripotencial del cáncer mediante un inhibidor de la ruta de Stat3. El método inhibe la autorrenovación de las CSC o mata a las CSC. El método puede realizarse *in vitro* o *in vivo* para tratar un cáncer, en especial cánceres que presentan CSC y que presentan actividades aberrantes de la ruta de Stat3, por ejemplo, actividades sobreactivas. Estos dos criterios pueden satisfacerse en virtud del conocimiento institucional, es decir, si se ha descubierto que el cáncer del paciente contiene CSC y presenta actividades aberrantes de la ruta de Stat3, o pueden confirmarse en el paciente individual, por ejemplo, a través de ensayos realizados sobre una biopsia. En una realización preferida, se sabe o se ha confirmado que las CSC poseen actividades aberrantes de la ruta de Stat3.

Los cánceres en los que, en la actualidad, se ha descubierto que contienen CSC y actividades aberrantes de la ruta de Stat3 incluyen, pero no se limitan a cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, melanoma, sarcoma, cáncer hepático, tumores cerebrales, mieloma múltiple y leucemia. También se ha descubierto que muchas de las formas metastásicas de estos cánceres contienen CSC y actividades aberrantes de la ruta de Stat3, tales como el cáncer de mama metastásico. En una característica, los métodos de la presente descripción pueden practicarse para tratar un cáncer seleccionado de este grupo. En una realización, los métodos de la descripción pueden practicarse para curar un cáncer seleccionado de los siguientes: cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colorrectal, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer gástrico y cáncer de próstata.

Además, puesto que las CSC han demostrado ser fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la recurrencia del cáncer, los métodos de la descripción pueden practicarse para tratar un cáncer que sea metastásico, refractario a una quimioterapia o radioterapia, inherentemente resistente a la quimioterapia, o que haya recurrido en un sujeto después de un tratamiento inicial. En una realización, el inhibidor de la ruta de Stat3 se aísla, purifica o sintetiza, y puede seleccionarse del grupo que consiste en un inhibidor de Stat3 de molécula pequeña, un agente de ARNi contra Stat3, un agente antisentido contra Stat3, un inhibidor de Stat3 peptidomimético, y un inhibidor de Stat3 oligodesoxinucleotídico de cuarteto-G. El mecanismo de la inhibición puede seleccionarse del grupo que consiste en inhibir sustancialmente la fosforilación de la proteína Stat3, inhibir sustancialmente la dimerización de la proteína Stat3, inhibir sustancialmente la translocación nuclear de la proteína Stat3, inhibir sustancialmente la actividad de unión al ADN de la proteína Stat3, e inhibir sustancialmente las actividades de transcripción de la proteína Stat3.

La presente invención proporciona una composición que comprende (i) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil]éster del ácido fosfórico, y 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una de sus sales farmacéuticamente aceptables o solvatos, y (ii) un excipiente, vehículo o diluyente para su uso para inhibir una célula madre del cáncer para tratar un cáncer en el que se ha descubierto la presencia de células madre del cáncer y la presencia de una actividad aberrante de la ruta de Stat3, en un sujeto que lo necesite, en la que el excipiente, vehículo o diluyente comprende:

un lípido seleccionado del grupo que consiste en un fosfolípido, fosfatidilcolina sintética, fosfatidilcolina natural, esfingomielina, ceramida, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, colesterol, sulfato de colesterol, y lípidos conjugados con haptenos y polietilenglicol (PEG) para la administración intravenosa; o

un material ceroso seleccionado del grupo que consiste en mono-, di- o triglicéridos, mono- o diésteres de ácidos grasos de PEG, vitamina E conjugada con PEG, y Gelucire para la administración oral; o

el excipiente, vehículo o diluyente está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una emulsión micelar, una suspensión, y una suspensión de nanopartículas, y comprende además albúmina humana para la administración intravenosa.

5 El inhibidor es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxiethyl)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil]éster del ácido fosfórico, y 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, un enantiómero, diastereómero, tautómero, y una de sus sales o solvatos (denominado en los sucesivo en la presente el "compuesto de la invención").

10 En un segundo aspecto, la presente descripción proporciona un método para inhibir la actividad de la ruta de Stat3 celular. El método incluye administrar a la célula una cantidad eficaz del compuesto de la invención, de modo que al menos se reduce la actividad de la ruta de Stat3 no deseada, por ejemplo, en al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95%. En una realización, la célula es una CSC, o es cancerosa. El método puede inducir la muerte celular o inhibir la autorrenovación en la célula. El método puede realizarse *in vitro* o *in vivo*.

15 En un tercer aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con una actividad aberrante de la ruta de Stat3 en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención, de modo que al menos se reduce una actividad aberrante de la ruta de Stat3. En una característica, la actividad aberrante de la ruta de Stat3 puede identificarse mediante la expresión de Stat3 fosforilada o un regulador sustituto corriente arriba o abajo de la fosforilación de Stat3. El trastorno puede ser un cáncer. En una realización, se ha descubierto que el cáncer presenta actividades aberrantes de la ruta de Stat3, e incluye, pero no se limita a: cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, melanoma, carcinomas hepatocelulares, cáncer cervical, sarcomas, tumores cerebrales, cánceres gástricos, mieloma múltiple, leucemia y linfomas. El trastorno  
20 también puede ser un trastorno no canceroso que se haya descubierto que esté asociado con una actividad aberrante de la ruta de Stat3 y, en una realización, se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, enfermedades intestinales inflamatorias, artritis, trastorno de desmielinación autoinmunitario, enfermedad de Alzheimer, lesiones por reperusión tras isquemia, y esclerosis múltiple.

30 En un cuarto aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar a un paciente, e incluye las etapas de identificar un paciente mediante una actividad aberrante de la ruta de Stat3, y administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención. En una realización, la etapa de identificar al paciente mediante una actividad aberrante de la ruta de Stat3 comprende ensayar la expresión de Stat3 fosforilada, o un regulador sustituto corriente arriba o abajo de la fosforilación de Stat3. La etapa de identificar al paciente  
35 mediante una actividad aberrante de la ruta de Stat3 comprende ensayar un fluido o tejido enfermo tomado del paciente, que puede ser parte de un tumor.

En un quinto aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar a un paciente, e incluye las etapas de identificar un paciente diagnosticado con un trastorno asociado con una actividad aberrante de la ruta de Stat3, y administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención. En una realización, la  
40 etapa de identificar al paciente comprende ensayar al menos un biomarcador que indique el trastorno en el paciente.

En un sexto aspecto, la presente descripción proporciona un kit que incluye al menos un agente para diagnosticar un trastorno asociado con una actividad aberrante de la ruta de Stat3, que puede ser ensayar un biomarcador que indique la presencia del trastorno, y una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención.

45 En un séptimo aspecto, la presente descripción proporciona un kit que incluye al menos un agente para diagnosticar una actividad aberrante de la ruta de Stat3, y una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención. En una realización, el agente ensaya la expresión de Stat3 fosforilada o un regulador sustituto corriente arriba o abajo de la fosforilación de Stat3.

50 En un octavo aspecto, la presente descripción proporciona un método para inhibir una o más células madre del cáncer. El método incluye administrar a la célula madre del cáncer una cantidad eficaz del compuesto de la invención. El método puede realizarse *in vitro* o *in vivo* para tratar un cáncer en un sujeto. En una realización, se ha descubierto que el cáncer contiene CSC, e incluye, pero no se limita a cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, cáncer hepático, melanoma, mieloma múltiple, tumores cerebrales, sarcoma, meduloblastoma y leucemia. En una realización, el cáncer es metastásico. En otra realización, el cáncer es refractario a una quimioterapia o radioterapia. Por ejemplo,  
55 el cáncer puede ser inherentemente resistente a la quimioterapia. En otra realización, el cáncer ha recurrido en un sujeto después de un tratamiento inicial.

En un noveno aspecto, la presente descripción proporciona un método para identificar un candidato a fármaco capaz de inhibir una célula madre del cáncer, comprendiendo dicho método seleccionar un candidato a fármaco que inhiba

la actividad de la ruta de Stat3. El candidato a fármaco, en una realización, es capaz de inducir la muerte celular en la célula madre del cáncer, y en otra realización, de inhibir la autorrenovación de la CSC. En diversas realizaciones, el candidato a fármaco es un inhibidor de Stat3 de molécula pequeña, un agente de ARNi contra Stat3, un agente antisentido contra Stat3, un inhibidor de Stat3 peptidomimético, o un inhibidor de Stat3 oligodesoxinucleotídico de cuarteto-G. El candidato a fármaco puede tener una capacidad seleccionada de las siguientes: inhibe sustancialmente la fosforilación de la proteína Stat3, inhibe sustancialmente la dimerización de la proteína Stat3, inhibe sustancialmente la translocación nuclear de la proteína Stat3, inhibe sustancialmente la actividad de unión al ADN de la proteína Stat3, e inhibe sustancialmente las actividades de transcripción de la proteína Stat3.

En un décimo aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar a un sujeto para un cáncer refractario a un tratamiento convencional, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención. El tratamiento convencional puede ser, por ejemplo, una quimioterapia, una radioterapia y/o cirugía. En una realización, el cáncer es inherentemente resistente a la quimioterapia.

En un undécimo aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar o prevenir la recaída de un cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención. En una realización, la composición farmacéutica se administra como una terapia adyuvante después de la cirugía.

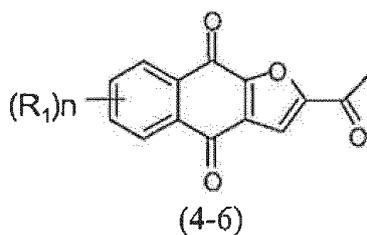
En un duodécimo aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar o prevenir la metástasis de un cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención. En una realización, la composición farmacéutica se administra como una terapia adyuvante después de la cirugía.

En un decimotercer aspecto, la presente descripción proporciona un método para dirigirse selectivamente a células del cáncer en un sujeto, por ejemplo, para tratar una enfermedad maligna, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención, de modo que la concentración del compuesto en el plasma del sujeto no se mantiene por encima de una concentración crítica durante más de 24 horas después de cada dosis, matando con ello selectivamente a las células del cáncer y al mismo tiempo no afectando a las células normales. Como alternativa, según el método de la invención, la concentración plasmática del compuesto no es mayor que la concentración crítica en un momento concreto después de cada dosis, por ejemplo, 12, 16, 20 o 24 horas. En una realización, la composición farmacéutica se administra de modo que la concentración del compuesto en el plasma del sujeto no se mantiene por encima de una concentración crítica, por ejemplo, continuamente, durante más de una duración de tiempo seleccionada del grupo que consiste en 12, 16 y 20 horas después de cada dosis. En diversas realizaciones, la concentración crítica es aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 30  $\mu\text{M}$ , o aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ . En una realización, las células del cáncer son parte de un cáncer seleccionado del grupo, o de cualquier de sus subgrupos, que consiste en cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer renal, sarcoma, mieloma múltiple, cáncer de mama metastásico, leucemia, linfoma, cáncer esofágico, tumor cerebral, glioma, cáncer de vejiga, cáncer endometrial, cáncer de tiroides, cáncer de los conductos biliares, cáncer de hueso, cáncer de ojo (retinoblastoma), cáncer de la vesícula biliar, cáncer de la pituitaria, cáncer rectal, cáncer de las glándulas salivares, cáncer nasofaríngeo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, neuroblastoma, cáncer de cérvix, leucemia, melanoma, epidermoide oral, cáncer de queratinocitos y de piel. En otra realización, las células del cáncer son parte de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama (que incluye el tipo metastásico), cáncer cervical, carcinoma colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer gástrico y cáncer de próstata.

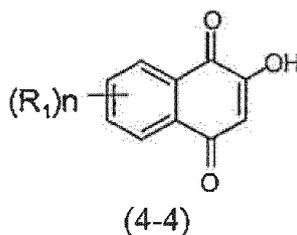
En un decimocuarto aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención. Los métodos según este aspecto de la invención pueden aplicarse a tratar un cáncer similar a los descritos con respecto a los aspectos previos de la invención. En una característica, el sujeto del tratamiento es un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

En un decimoquinto aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención, es decir, un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil]éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una de sus sales farmacéuticamente aceptables o solvatos, y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una característica, la composición es adecuada para la administración oral, nasal, tópica, rectal, vaginal o parenteral, o para una inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular.

En un decimosexto aspecto, la presente descripción también proporciona un proceso para preparar algunos de los compuestos de la invención. El método prepara un compuesto de fórmula 4-6,

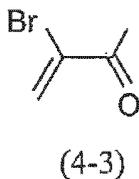


en el que R<sub>1</sub> es H, Cl o F, haciendo reaccionar un compuesto de fórmula 4-4,



- 5 con una cetona en un disolvente en presencia de una base y un agente oxidante. El agente oxidante puede ser, por ejemplo, O<sub>2</sub>, Br<sub>2</sub>, o CBrCl<sub>3</sub>. En una realización, la reacción se realiza en un recipiente abierto. En una característica, todas las etapas del proceso se realizan en el mismo espacio, es decir, en el mismo recipiente. En diversos ejemplos de realizaciones, el disolvente puede ser tetrahidrofurano (THF), dioxano o tolueno, y la base puede ser 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), trietilamina, o diisopropilamina.

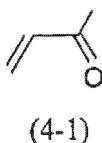
En una realización del anterior proceso, la cetona es un compuesto de fórmula 4-3:



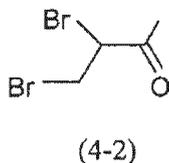
10

El anterior proceso puede incluir también las siguientes etapas:

hacer reaccionar un compuesto de fórmula 4-1,

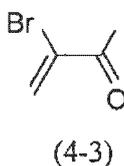


con bromuro con o sin un disolvente, para producir un compuesto de fórmula 4-2,



15

y después hacer reaccionar el compuesto de fórmula 4-2 en un disolvente en presencia de una base, para producir el compuesto de fórmula 4-3:



En un decimoséptimo aspecto, la presente descripción proporciona un compuesto con la fórmula de mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil]éster del ácido fosfórico.

En un decimoctavo aspecto, la presente descripción proporciona un compuesto con la fórmula de 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico.

- 5 En un decimonoveno aspecto, la presente descripción proporciona un proceso para preparar el compuesto mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil]éster del ácido fosfórico, comprendiendo dicho proceso hacer reaccionar el compuesto 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona con una disolución seleccionada del grupo que consiste en bis(trimetilsilil)amida de litio, bis(trimetilsilil)amida de sodio, y bis(trimetilsilil)amida de potasio, seguido de la adición de una disolución de clorofosfato de dimetilo. El proceso puede comprender también purificar un producto  
10 bruto obtenido a partir de la reacción disolviendo el producto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, lavándolo con NH<sub>4</sub>Cl saturado y agua, secándolo sobre MgSO<sub>2</sub>, y después haciendo pasar el producto a través de una columna de cromatografía.

- 15 En un vigésimo aspecto, la presente descripción proporciona un proceso para preparar el compuesto 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, comprendiendo dicho proceso hacer reaccionar el compuesto mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil]éster del ácido fosfórico con bromuro de trimetilsililo. El proceso puede comprender también purificar un producto bruto obtenido a partir de la reacción mediante HPLC semipreparativa.

Otros aspectos y realizaciones de la presente invención se indican a continuación o serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

#### Breve descripción de las figuras

- 20 La figura 1 ilustra las diferencias entre las terapias del cáncer convencionales y específicas de células madre del cáncer.

La figura 2 muestra la ruta de Stat3 en el cáncer.

La figura 3A demuestra que Stat3 está constitutivamente activa en las células satélite de Hoechst.

La figura 3B demuestra que Stat3 está constitutivamente activa en células CD133<sup>+</sup>.

- 25 Las figuras 4A y 4B demuestran que la inactivación de Stat3 en células madre del cáncer induce la apoptosis.

La figura 5 demuestra que la inactivación de Stat3 en células madre del cáncer inhibe la esferogénesis de las células madre del cáncer.

La figura 6 demuestra que el compuesto 401 inhibe la actividad de activación de la transcripción de Stat3.

La figura 7A demuestra que el compuesto 401 inhibe la actividad de unión al ADN de Stat3 en un extracto nuclear.

- 30 La figura 7B demuestra que los compuestos 401, 416 y 418 inhiben la actividad de unión al ADN de Stat3 en un extracto nuclear.

La figura 8A demuestra que el compuesto 401 inhibe la actividad de unión al ADN de Stat3 en tejidos de tumor de xenoinjerto.

- 35 La figura 8B demuestra que el compuesto 401 inhibe el nivel de expresión de los efectos corriente abajo de Stat3 en tejidos de tumor de xenoinjerto.

La figura 9A muestra la clasificación y el análisis de las células satélite de Hoechst.

La figura 9B demuestra que las células satélite de Hoechst son tan sensibles como las células que no son satélite frente al compuesto 401.

La figura 10A demuestra que el compuesto 401 es apoptótico para las células satélite de Hoechst.

- 40 La figura 10B demuestra que el compuesto 401 es apoptótico para las células CD133<sup>+</sup>.

La figura 11 demuestra que el compuesto 401 bloquea la formación de esferas de CD44<sup>high</sup>.

La figura 12 demuestra que un tratamiento *in vivo* con el compuesto 401 disminuye la esferogénesis de las células de tumor xenoinjertadas.

La figura 13 demuestra que el compuesto 401 induce la apoptosis en células de cáncer.

- 45 La figura 14 demuestra que el compuesto 401 muestra actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano y que se comporta de una manera diferente a la quimioterapia convencional, puesto que abole

el rebote tumoral.

La figura 15 demuestra que el compuesto 401 muestra actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de cabeza y cuello humano.

5 La figura 16 demuestra que el compuesto 401 muestra actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano.

La figura 17 demuestra que el compuesto 401 muestra actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata humano.

La figura 18 demuestra que el compuesto 401 muestra actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano.

10 La figura 19 demuestra que el compuesto 401 muestra actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer hepático humano.

La figura 20 demuestra que el compuesto 401 inhibe la metástasis en el modelo ISMS.

La figura 21 muestra la farmacocinética del compuesto 401 en ratas.

### Descripción detallada

15 Tal como se emplean en la presente, las formas en singular “un/una” y “el/la” incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión “una célula” incluye una pluralidad de células e incluye sus mezclas.

20 Los términos “aislado” y “purificado”, tal como se emplean en la presente, se refieren a un material que esta sustancial o fundamentalmente exento de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad generalmente se determinan empleando técnicas químicas analíticas, tales como una electroforesis en gel de poliacrilamida o una cromatografía líquida de alta resolución.

25 Tal como se emplean en la presente, la expresión “célula o células madre del cáncer” y el término “CSC” son intercambiables. Las CSC son de mamífero y, en realizaciones preferidas, estas CSC son de origen humano, pero no se pretende que se limiten a estas. Las células madre del cáncer se definen y se caracterizan funcionalmente como una población de células que surgen de un tumor sólido que: (1) tienen una gran capacidad proliferativa; (2) son capaces de realizar una división celular asimétrica para generar uno o más tipos de progenie diferenciada con menor potencial proliferativo o para desarrollarse; y (3) son capaces de realizar divisiones celulares simétricas para la autorrenovación o el automantenimiento. Otras estrategias habituales para caracterizar a las CSC implican la morfología y el estudio de los marcadores de la superficie celular, el perfil transcripcional, y la respuesta a fármacos.

30 En la bibliografía científica, las CSC también se denominan células iniciadoras de tumor/cancer, células similares a células madre del cáncer, células del cáncer similares a células madre, células altamente tumorigénicas, células madre de tumores, células madre de tumores sólidos, células supervivientes a fármacos (DSC), células resistentes a fármacos (DRC) o células supermalignas.

35 Tal como se emplea en la presente, el término “autorrenovación” se refiere a la capacidad de las células madre del cáncer para generar nuevas células madre del cáncer tumorigénicas para reponer o para aumentar su número.

40 Tal como se emplean en la presente, los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen el trastorno fisiológico en mamíferos en el que una población de células se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Las “células del cáncer” y las “células del tumor”, tal como se emplean en la presente, se refieren a la población total de células derivadas de un tumor, que incluyen las células no tumorigénicas, que comprenden la mayor parte de la población de células tumorales, y las células madre tumorigénicas (células madre del cáncer). Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más concretos de estos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

45 Un “tumor”, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier masa de tejido se resulta de un excesivo crecimiento o proliferación celular, tanto benigno (no canceroso) como maligno (canceroso), que incluye las lesiones precancerosas.

50

La “metástasis”, tal como se emplea en la presente, se refiere al proceso mediante el cual un cáncer se extiende o se traslada desde el sitio de origen hacia otras regiones del cuerpo, con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en la nueva localización. Una célula “metastásica” o “metastatizante” es una célula que pierde los contactos adhesivos con las células vecinas y migra a través de la corriente sanguínea o la linfa desde el sitio primario de la

enfermedad para invadir estructuras corporales vecinas.

Tal como se emplea en la presente, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero) que incluye, pero no se limita a seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que será el receptor de un tratamiento concreto. Generalmente, los términos "sujeto" y "paciente" se emplean de modo intercambiable en la presente en referencia a un sujeto humano.

Los términos tales como "tratar" o "tratamiento" o "aliviar" o las expresiones "para tratar" o "para aliviar", tal como se emplean en la presente, se refieren 1) a medidas terapéuticas que curan, frenan, disminuyen los síntomas y/o detienen el avance de una afección o trastorno patológico diagnosticado, y 2) a medidas profilácticas o preventivas que evitan o frenan el desarrollo de la afección o trastorno patológico que se quiere tratar. Así, los sujetos que necesitan tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno; los propensos a padecer el trastorno; y aquellos en los que se va a prevenir el trastorno. Un sujeto se "trata" con éxito según los métodos de la presente descripción si el paciente presenta uno o más de los siguientes: una reducción en el número o la ausencia completa de células del cáncer; una reducción en el tamaño tumoral; la inhibición o la ausencia de infiltración de células del cáncer hacia órganos periféricos, que incluye la propagación del cáncer hacia tejidos blandos y hueso; la inhibición o la ausencia de metástasis tumoral; la inhibición o la ausencia de crecimiento tumoral; el alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; una menor morbilidad y mortalidad; y una mejora en la calidad de vida.

Tal como se emplean en la presente, las expresiones "que inhibe", "para inhibir" y sus equivalentes gramaticales, cuando se emplean en el contexto de una bioactividad, se refieren a la infrarregulación de la bioactividad, que puede reducir o eliminar la función que se quiere tratar, tal como la producción de una proteína o la fosforilación de una molécula. En realizaciones concretas, la inhibición puede referirse a una reducción de aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95% de la actividad que se quiere tratar. Cuando se emplean en el contexto de un trastorno o una enfermedad, las expresiones se refieren al éxito en la prevención de la aparición de los síntomas, el alivio de los síntomas, o la eliminación de la enfermedad, afección o trastorno.

La expresión "excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable", tal como se emplea en la presente, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante líquido o sólido, implicado en el transporte del agente farmacéutico concreto desde un órgano o porción del cuerpo hacia otro órgano o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden actuar como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua apirógena; disolución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico; disolución de tampón fosfato; y otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas en las formulaciones farmacéuticas. En las composiciones también pueden estar presentes agentes humectantes, emulgentes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio, estearato de magnesio y copolímero de óxido de polietileno-óxido de polipropileno, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Los compuestos de la presente invención pueden formar sales que también están dentro del alcance de esta invención. En la presente, se entiende que la referencia a un compuesto de la presente invención incluye la referencia a sus sales, a menos que se indique lo contrario. El término "sal" (o "sales"), tal como se emplea en la presente, indica sales ácidas y/o básicas formadas con ácidos y bases inorgánicos y/u orgánicos. Además, cuando un compuesto de la presente invención contiene un resto básico, tal como una piridina o imidazol, y un resto ácido, tal como, pero sin limitarse a ácido carboxílico, pueden formarse iones bipolares ("sales internas") y se incluyen dentro del término "sal" (o "sales"), tal como se emplea en la presente. Se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables (es decir, no tóxicas, fisiológicamente aceptables), aunque otras sales también son útiles, por ejemplo, en etapas de aislamiento o purificación, en las que pueden emplearse durante la preparación. Las sales de los compuestos de la presente invención pueden formarse, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto I, II o III con una cantidad de ácido o base, tal como con una cantidad equivalente, en un medio, tal como un medio en el que la sal precipita o en un medio acuoso, seguido de una liofilización.

En la presente también se contemplan los solvatos de los compuestos de la invención. Los solvatos de los compuestos de la presente invención incluyen, por ejemplo, los hidratos.

Estudios recientes han descubierto la presencia de células madre del cáncer (CSC) con una capacidad exclusiva para regenerar tumores. Estas CSC existen en casi todos los tipos de tumores y están relacionadas funcionalmente con el crecimiento maligno continuado, la metástasis, la recurrencia y la resistencia a fármacos del cáncer. Las CSC y sus progenies más diferenciadas parecen tener características biológicas notablemente diferentes. Las selecciones convencionales de fármacos para el cáncer dependen de la medición de la cantidad de masa tumoral y,

por tanto, no reflejan necesariamente los fármacos que actúan de modo específico sobre las CSC. De hecho, se ha demostrado que las CSC son resistentes a las quimioterapias y la radioterapia convencionales, y que cada vez aparecen más enriquecidas después de los tratamientos anticáncer convencionales, lo cual provoca la recurrencia y que el cáncer sea refractario. Los métodos para aislar estas células incluyen, pero no se limitan a la identificación de su capacidad para efluir Hoechst 33342, la identificación mediante los marcadores de la superficie que expresan estas células, tales como CD133, CD44, CD166 y otros, y el enriquecimiento según su propiedad tumorigénica. Las pruebas cada vez mayores que relacionan a las células madre del cáncer con la tumorigénesis descubren la enorme oportunidad terapéutica de dirigirse a las células madre del cáncer.

La clave para utilizar este potencial sin explotar es la identificación y la validación de rutas que sean selectivamente importantes para la supervivencia y la autorrenovación de las CSC. Aunque en el pasado se han elucidado múltiples rutas que subyacen a la tumorigénesis en el cáncer y en células madre embrionarias o células madre de adulto, no se han identificado y validado rutas para la autorrenovación y la supervivencia de las CSC.

La presente descripción proporciona pruebas de que la actividad de la ruta de Stat3 resulta crítica para la supervivencia y la autorrenovación de las CSC (ejemplo 1). La presente descripción también proporciona compuestos que son inhibidores eficaces de las actividades de la ruta de Stat3 (ejemplo 2). La presente descripción también proporciona datos *in vitro* e *in vivo* de que estos inhibidores de Stat3 inhiben la autorrenovación de las CSC y son apoptóticos para las CSC (ejemplo 3). La presente descripción también demuestra que estos compuestos pueden matar selectivamente un amplio espectro de células del cáncer *in vitro* (ejemplo 4) e inhiben una gama similarmente amplia de cánceres *in vivo* (ejemplo 5). Además, la presente descripción confirma empíricamente la eficacia de los inhibidores de Stat3 contra un cáncer metastásico (ejemplo 6). Además, la presente descripción confirma empíricamente que estos compuestos pueden lograr una exposición PK deseada para la destrucción selectiva de células del cáncer *in vivo* (ejemplo 7).

Los datos proporcionados en la presente, combinados con recientes descubrimientos en la investigación de las CSC, permiten a la presente descripción proporcionar una serie de métodos dirigidos a inhibir las CSC, o tratar cánceres que presentan CSC de modo específico, o tratar cánceres en general. En la presente también se proporcionan métodos dirigidos a inhibir la actividad de la ruta de Stat3 en células o tratar trastornos cancerosos y no cancerosos, que estén asociados con unas actividades aberrantes de la ruta de Stat3. La presente descripción también proporciona métodos relacionados (por ejemplo, fabricación y selección de candidatos a fármaco), materiales, composiciones y kits.

Con el descubrimiento de que la infrarregulación o el bloqueo de la ruta de Stat3 inhibe la autorrenovación y la supervivencia de las CSC (ejemplo 1), la presente descripción proporciona un método para inhibir las células madre del cáncer, en el que al menos una parte de la actividad de la ruta de Stat3 en las CSC se inhibe a través de un inhibidor de la ruta de Stat3. En una realización, la mayoría, es decir, más del 50% de la actividad de la ruta de Stat3 se inhibe. En otra realización, sustancialmente toda la actividad de la ruta de Stat3 se inhibe. El método puede evitar que las CSC se autorrenueven, de modo que ya no puedan reponer su número dividiéndose para producir células CSC tumorigénicas, o el método puede inducir la muerte celular en CSC.

Este método puede utilizarse para tratar el cáncer de un sujeto. Los cánceres en los que se han descubierto CSC y actividades aberrantes (por ejemplo, sobreactivas o constitutivamente activas) de la ruta de Stat3 son buenos candidatos para este tratamiento, e incluyen, pero no se limitan a cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, melanoma, carcinomas hepatocelulares, cáncer cervical, sarcomas, tumores cerebrales, cánceres gástricos, mieloma múltiple, leucemia y linfomas. En una realización, el método se emplea para tratar cánceres hepáticos, cánceres de cabeza y cuello, cánceres pancreáticos y/o cánceres gástricos. En otra realización, el método se emplea para tratar el mieloma múltiple, tumores cerebrales y sarcomas.

Además, puesto que las CSC han demostrado ser fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la reaparición del cáncer, puede practicarse cualquier método de la descripción dirigido a la inhibición de las CSC para tratar un cáncer que sea metastásico, refractario a una quimioterapia o radioterapia, o que haya recurrido en el sujeto después de un tratamiento inicial.

En una realización, el inhibidor se aísla, purifica o sintetiza, y puede seleccionarse del grupo que consiste en un inhibidor de Stat3 de molécula pequeña, un agente de ARNi contra Stat3, un agente antisentido contra Stat3, un inhibidor de Stat3 peptidomimético, y un inhibidor de Stat3 oligodesoxinucleotídico de cuarteto-G. El inhibidor también puede aislarse o purificarse a partir de un producto natural.

El mecanismo de la inhibición puede seleccionarse para dirigirse a cualquier etapa en la ruta de Stat3. Por ejemplo, el inhibidor puede inhibir sustancialmente la fosforilación de la proteína Stat3, inhibir sustancialmente la dimerización de la proteína Stat3, inhibir sustancialmente la translocación nuclear de la proteína Stat3, inhibir sustancialmente la actividad de unión al ADN de la proteína Stat3 y/o inhibir sustancialmente las actividades de transcripción de la proteína Stat3. Como alternativa, el inhibidor de la ruta de Stat3 puede inhibir uno o más componentes corriente arriba o abajo en la ruta de Stat3.

La ruta de Stat3 puede activarse en respuesta a citoquinas, tales como IL-6, o por una serie de tirosina quinasas, tales como EGFR, JAK, Abl, KDR, c-Met, Src, y Her2. Los efectores corriente abajo de Stat3 incluyen, pero no se limitan a Bcl-xl, c-Myc, ciclina D1, Vegf, MMP-2, y survivina (figura 2). La ruta de Stat3 se encuentra aberrantemente activa en una amplia diversidad de enfermedades humanas, tal como se muestra en la tabla 1. Las muestras clínicas existentes estudiadas demuestran que aparece una ruta de Stat3 persistentemente activa en más de la mitad de los cánceres de mama y pulmón, carcinomas hepatocelulares, mielomas múltiples y más del 95% de los cánceres de cabeza y cuello. También se ha demostrado una Stat3 activada en una serie de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Además, puesto que la inflamación mediada por citoquinas, tales como la interleuquina 6, es el origen causativo habitual de la aterosclerosis [38], la enfermedad vascular periférica [39, 40], la enfermedad de la arteria coronaria [39, 40], la hipertensión [41], la osteoporosis [42], la diabetes de tipo 2 [39] y la demencia [43], y que la ruta gp130-Jak-Stat es la ruta principal activada por IL-6, la inhibición de la ruta de Stat3 también puede prevenir estas enfermedades.

Tabla 1 - Activación de la ruta de Stat3 en enfermedades humanas

ENFERMEDADES		REF.		
ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS	Tumores sólidos	Cáncer de mama	[44]	
		Cáncer de cabeza y cuello (SCCHN)	[45]	
		Cáncer de pulmón	[46]	
		Cáncer de ovario	[47]	
		Cáncer pancreático	[48]	
		Carcinoma colorrectal	[49]	
		Cáncer de próstata	[50]	
		Carcinoma de células renales	[51]	
		Melanoma	[52]	
		Carcinomas hepatocelulares	[34]	
		Cáncer cervical	[53]	
		Cáncer endometrial	[53]	
		Sarcomas	[54, 55]	
		Tumores cerebrales	[56]	
		Cánceres gástricos	[27]	
	Tumores hematológicos	Mieloma múltiple	[57]	
		Leucemia	Leucemia dependiente de HTLV-1	[58]
			Leucemia mielógena crónica	[51]
			Leucemia mielógena aguda	[59]
			Leucemia de linfocitos granulares grandes	[60]
		Linfomas	Linfoma de Burkitt/relacionado con EBV	[61]
			Micosis fungoides	[51]
Dependiente de Saimiri HSV (células T)			[51]	
Linfoma de células T cutáneo			[62]	
Enfermedad de Hodgkin	[51]			
Linfoma de células grandes anaplásico	[63]			

ENFERMEDADES INMUNOLÓGICAS	Enfermedades inflamatorias	Enfermedades del intestino inflamatorias	[64]
		Artritis inflamatoria	[65-67]
		Enfermedades de Crohn	[68]
		Trastornos inflamatorios crónicos	[69]
	Autoinmunitarias	Artritis reumatoide	[65, 66, 70-72]
		Lupus eritematoso sistémico	[73]
	Asma		[74]
	Alergia		[75]
Infecciones		[76]	
TRASTORNOS PROLIFERATIVOS	Psoriasis		[77]
	Queloides		[78]
	Verrugas		[79]
	Síndrome mielodisplásico		[80]
	Policitemia vera		[81]
ENFERMEDADES DEL SNC	Enfermedad de Alzheimer		[36, 82, 83]
	Esclerosis múltiple (MS)		[36, 82, 84]

5 En una realización, el inhibidor de Stat3 según la presente descripción es: 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil]éster del ácido fosfórico, y 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, un enantiómero, diastereómero, tautómero, y una de sus sales o solvatos (el “compuesto de la invención”) (ejemplo 2). La presente descripción también proporciona datos *in vitro* e *in vivo* que indican que el compuesto de la invención inhibe la autorrenovación de las CSC e induce la apoptosis en CSC (ejemplo 3).

10 Después de proporcionar pruebas de que la infrarregulación de la ruta de Stat3 inhibe las CSC, la presente descripción proporciona un método para identificar un candidato a fármaco capaz de inhibir una célula madre del cáncer. El método comprende seleccionar un candidato a fármaco que inhiba la actividad de la ruta de Stat3. En diversas realizaciones, el candidato a fármaco es un inhibidor de Stat3 de molécula pequeña, un agente de ARNi contra Stat3, un agente antisentido contra Stat3, un inhibidor de Stat3 peptidomimético, o un inhibidor de Stat3 oligodesoxinucleotídico de cuarteto-G.

15 En una realización, el candidato a fármaco es capaz de inducir la muerte celular en CSC o al menos inhibir su autorrenovación. Se pueden emplear diversas fases en la ruta para la selección del candidato a fármaco. Por ejemplo, diversas realizaciones del método pueden seleccionar candidatos a fármaco que inhiban sustancialmente la fosforilación de la proteína Stat3, que inhiban sustancialmente la dimerización de la proteína Stat3, que inhiban sustancialmente la translocación nuclear de la proteína Stat3, que inhiban sustancialmente las actividades de unión al ADN de la proteína Stat3, o que inhiban sustancialmente las actividades de transcripción de la proteína Stat3.

20 Tal como demuestra el siguiente ejemplo 2, el compuesto de la invención inhibe la actividad de transcripción de Stat3 y la actividad de unión al ADN de Stat3 *in vitro*. El ejemplo 2 también demuestra que el compuesto de la invención inhibe *in vivo* la expresión de los efectores corriente abajo de Stat3 (por ejemplo, ciclina D1 y survivina) y la actividad de unión al ADN de Stat3.

25 Por consiguiente, en otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para inhibir la actividad de la ruta de Stat3 celular, en el que se administra una cantidad eficaz del compuesto de la invención. En otro aspecto, el compuesto de la invención puede utilizarse para formular una composición farmacéutica para tratar o prevenir trastornos o afecciones asociados con actividades aberrantes de la ruta de Stat3. En la presente, un trastorno se considera “asociado con” actividades aberrantes de la ruta de Stat3 si un paciente que padece el trastorno, que puede ser un subtipo dentro de un tipo de trastorno, generalmente presenta, en al menos algunas de las células del paciente, una actividad aberrante de la ruta de Stat3 que puede contribuir, pero no necesariamente, a la patología

del trastorno. Algunos de los trastornos en los que se han descubierto actividades aberrantes de la ruta de Stat3 incluyen, pero no se limitan a enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades del intestino inflamatorias, artritis, trastorno de desmielinación autoinmunitario, enfermedad de Alzheimer, ictus, lesiones por reperfusión tras isquemia, y esclerosis múltiple. Algunos de los trastornos que se ha descubierto que están asociados con actividades aberrantes de la ruta de Stat3 son cánceres, e incluyen, pero no se limitan a diversos tipos de cánceres de mama, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de pulmón, cánceres de ovario, cánceres pancreáticos, carcinoma colorrectal, cánceres de próstata, carcinoma de células renales, melanoma, carcinomas hepatocelulares, cánceres cervicales, sarcomas, tumores cerebrales, cánceres gástricos, mieloma múltiple, leucemia y linfomas.

5  
10  
15  
Con relación a este aspecto de la descripción, se proporciona un kit que incluye uno o más agentes para diagnosticar un trastorno asociado con actividades aberrantes de la ruta de Stat3, y una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención u otro inhibidor eficaz de la ruta de Stat3. El agente de diagnóstico puede ser cualquier reactivo adecuado dependiendo del trastorno sospechoso, y puede incluir agentes necesarios para extraer una muestra de sangre, tomar una biopsia, seleccionar una biomolécula (por ejemplo, un antígeno o un anticuerpo), o extraer información genética de una muestra. El agente puede incluir un disolvente, un detergente, un anticoagulante, un antígeno, un anticuerpo, una enzima, un cebador de PCR, etc.

20  
25  
Tanto si un paciente ha sido diagnosticado con un trastorno del cual se ha descubierto que implica una actividad aberrante de Stat3 como si no ha sido diagnosticado, un médico siempre puede ordenar que se realice un ensayo para comprobar si existe una actividad aberrante de Stat3 en una muestra de biopsia tomada del paciente. Por tanto, se proporciona un kit que incluye: uno o más agentes para diagnosticar actividades aberrantes de la ruta de Stat3, y una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención u otro inhibidor eficaz de la ruta de Stat3. En una característica, la actividad aberrante de la ruta de Stat3 puede identificarse a través de cualquier medio analítico adecuado para estudiar cualquier indicio de dicha actividad, por ejemplo, expresión (nivel, duración, etc.) de la Stat3 fosforilada o de un regulador sustituto corriente arriba o abajo de la fosforilación de Stat3. De modo similar al kit descrito previamente, el agente de diagnóstico puede ser cualquier reactivo adecuado dependiendo de los indicios de la actividad aberrante de la ruta de Stat3 que se estén analizando en el ensayo.

30  
Tal como demuestra el siguiente ejemplo 3, el compuesto de la invención, que es al menos un inhibidor de la ruta de Stat3, mata a las células madre del cáncer. El ejemplo 3 también demuestra que el compuesto de la invención también inhibe la esferogénesis de CSC, una indicación del éxito de la inhibición de la autorrenovación de las CSC, tanto *in vitro* como *in vivo*.

35  
Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción proporciona un método para inhibir las células madre del cáncer, en el que se administra a las células una cantidad eficaz del compuesto de la invención. Los cánceres en los que se han descubierto CSC son buenos candidatos para dichos tratamientos, e incluyen, pero no se limitan a diversos tipos de cánceres de mama, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de pulmón, cánceres de ovario, cánceres pancreáticos, carcinoma colorrectal, cánceres de próstata, cánceres hepáticos, melanoma, mieloma múltiple, tumores cerebrales, sarcomas, meduloblastoma y leucemia.

40  
Además, puesto que se ha demostrado que las CSC son fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la reparación del cáncer, puede practicarse cualquier método de la descripción dirigido a inhibir las CSC para tratar un cáncer que sea metastásico, refractario a una quimioterapia o radioterapia, o que haya recurrido en el sujeto después de un tratamiento inicial. El siguiente ejemplo 6 específicamente ensaya *in vivo* la eficacia antimetástasis del compuesto de la invención, y los datos demuestran una reducción significativa en el número de focos tumorales primarios y la metástasis del hígado espontánea.

45  
50  
55  
En el siguiente ejemplo 4, no solo se demuestra que el compuesto de la invención provoca la apoptosis en un amplio espectro de células del cáncer, sino que también muestra selectividad en su citotoxicidad, lo cual resulta crítico para desarrollar nuevos productos terapéuticos de baja toxicidad. La citotoxicidad selectiva, tal como se emplea en la presente, se refiere a la capacidad de un compuesto para matar a las células del cáncer y al mismo tiempo no afectar sustancialmente a las células normales, a veces bajo ciertas condiciones. Las células normales habitualmente se refieren a las células sanas no tumorigénicas. Las condiciones que producen una citotoxicidad selectiva para un candidato a fármaco son difíciles de predecir, porque requieren el conocimiento del mecanismo subyacente de la citotoxicidad. Por ejemplo, la disminución de la toxicidad de un fármaco anticáncer que se dirige a la formación de microtúbulos durante la mitosis presenta factores muy diferentes con los que trabajar que un fármaco que bloquee procesos metabólicos celulares. Una condición que sea adecuada para engendrar una citotoxicidad selectiva debe equilibrarse con la necesidad de que el fármaco sea lo suficientemente tóxico como para matar a las células del cáncer de modo eficaz y sea lo suficientemente tolerable para las células normales. Por ejemplo, si se emplea una concentración menor, esto a menudo significa una infusión prolongada para poder matar a las células del cáncer.

60  
A partir de los datos generados en los ejemplos de esta descripción, que incluyen los que aparecen en el ejemplo 4, parece que puede lograrse una citotoxicidad selectiva para el compuesto de la invención si las células afectadas no se exponen a una concentración crítica del compuesto continuamente más allá de cierta duración de tiempo. En un método dirigido a matar selectivamente a las células del cáncer en un sujeto, una composición farmacéutica que

- contenga el compuesto de la invención se administra al sujeto, de modo que la concentración del compuesto en el plasma del sujeto no se mantenga por encima de una concentración crítica durante más de 24 horas después de cada dosis. Este método puede utilizarse para tratar todos los cánceres, incluyendo cualquiera de los grupos de cánceres descritos en la presente, y para tratar un trastorno asociado a Stat3, habiéndose proporcionado una lista ejemplar anteriormente y por tanto no es necesario repetir. Como alternativa, la duración de tiempo puede restringirse aún más hasta 12, 16 y 20 horas después de cada dosis. La concentración crítica para cada compuesto puede variar. En diversas realizaciones de la presente invención, la concentración crítica es aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 30  $\mu\text{M}$  o aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ .
- En una realización del método, el cáncer que se está tratando se selecciona del siguiente grupo: cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer renal, sarcoma, mieloma múltiple, cáncer de mama metastásico, cáncer de próstata metastásico, leucemia, linfoma, cáncer esofágico, tumor cerebral, glioma, cáncer de vejiga, cáncer endometrial, cáncer de tiroides, cáncer de los conductos biliares, cáncer de hueso, cáncer de ojo (retinoblastoma), cáncer de la vesícula biliar, cáncer de la pituitaria, cáncer rectal, cáncer de las glándulas salivares, y cáncer nasofaríngeo.
- En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto, en el que se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención. El cáncer puede ser metastásico. El sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un ser humano.
- Para cualquiera de los métodos para tratar un sujeto descritos en la presente, la presente descripción proporciona unos intervalos de dosificación eficaces, frecuencias de dosificación y concentraciones plasmáticas de los compuestos. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a una dosificación: (a) de aproximadamente 1  $\text{mg}/\text{m}^2$  a aproximadamente 5.000  $\text{mg}/\text{m}^2$  (IV), o de aproximadamente 1  $\text{mg}/\text{m}^2$  a aproximadamente 50.000  $\text{mg}/\text{m}^2$  (PO); (b) de aproximadamente 2  $\text{mg}/\text{m}^2$  a aproximadamente 3.000  $\text{mg}/\text{m}^2$  (IV), o de aproximadamente 10  $\text{mg}/\text{m}^2$  a aproximadamente 50.000  $\text{mg}/\text{m}^2$  (PO). En diversas realizaciones, el compuesto de la presente invención puede administrarse en días alternos (Q2D), a diario (QD) o dos veces diarias (BID). En una realización, la composición farmacéutica se administra por ruta oral y no más de cuatro veces diarias (QID).
- En una característica, la composición farmacéutica se administra al sujeto de modo que la concentración del compuesto en el plasma del sujeto no se mantiene por encima de una concentración crítica durante más de 24 horas (o 12, 16 y 20 horas) después de cada dosis. Según otras realizaciones de la invención, la concentración plasmática del compuesto no es mayor que la concentración crítica en un momento concreto después de cada dosis, por ejemplo, 12, 16, 20 o 24 horas, como un régimen que evita la toxicidad no selectiva. En diversas realizaciones de la presente invención, la concentración crítica es de aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , aproximadamente 30  $\mu\text{M}$  o aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ . Las composiciones, en ciertos casos, se aíslan, purifican o sintetizan.
- En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención, y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una característica, la composición es adecuada para la administración oral, nasal, tópica, rectal, vaginal o parenteral, o para una inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular.
- Las formulaciones de la presente descripción incluyen las que son adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (que incluye bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse de modo conveniente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica farmacéutica. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma de dosificación unitaria variará dependiendo del mamífero que se está tratando y de la ruta de administración concreta. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación unitaria, generalmente será la cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. En general, con respecto al 100%, esta cantidad variará, por ejemplo, de aproximadamente 1% a aproximadamente 99% de ingrediente activo, de aproximadamente 5% a aproximadamente 70%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 30%.
- Las composiciones o formulaciones terapéuticas de la descripción adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (utilizando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (utilizando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como colutorios y similares, que contienen cada uno una cantidad predeterminada del compuesto de la invención como ingrediente activo. El compuesto de la invención también puede administrarse como una inyección en embolada, electuario o pasta.
- En las formas de dosificación sólidas de la descripción para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el compuesto de la invención se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o cualquiera de los siguientes:

5 cargas o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; ligantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, carbonato de calcio, y almidón glicolato de sodio; agentes que retrasan la disolución, tales como parafina; aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol y copolímero de óxido de polietileno-óxido de polipropileno; absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y sus mezclas; y agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, los comprimidos y las píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina blanda y dura, utilizando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

15 Las formas de dosificación líquidas para la administración oral del compuesto de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabe y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes que habitualmente se emplean en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulgentes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y sus mezclas. Además pueden emplearse ciclodextrinas, por ejemplo, hidroxipropil-beta-ciclodextrina, para solubilizar los compuestos.

25 Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulgentes y suspensores, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes. Las suspensiones, además de uno o más compuestos de la invención, pueden contener agentes suspensores tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y sus mezclas.

30 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la descripción para la administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que puede prepararse mezclando uno o más compuestos de la invención, con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorios o un salicilato, y que sean sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a la temperatura corporal y, por tanto, se fundirán en el recto o la cavidad vaginal y liberarán los agentes farmacéuticos activos de la invención. Las formulaciones de la presente descripción que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en forma de pulverizado que contengan dichos vehículos, tal como se conocen en la técnica como adecuados.

35 Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de una composición según la descripción incluyen polvos, pulverizados, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse bajo condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con los conservantes, tampones o propelentes necesarios.

40 Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además del compuesto de la invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de la celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o sus mezclas.

45 Los polvos y los pulverizados pueden contener, además de un compuesto de esta invención, excipientes, tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los pulverizados también pueden contener propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.

También se contemplan las formulaciones oftálmicas, los ungüentos oculares, polvos, disoluciones y similares, como incluidas en el alcance de esta descripción.

50 Las composiciones farmacéuticas de esta descripción adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más compuestos según la invención, en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos, que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, o agentes suspensores o espesantes.

55 En algunos casos, para prolongar el efecto de la composición según la descripción, resulta deseable frenar su absorción por el cuerpo después de una inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de un material cristalino o amorfo que tenga poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco entonces depende de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño de los cristales y la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retrasada de una composición administrada por

ruta parenteral puede lograrse disolviendo o suspendiendo el compuesto en un vehículo oleoso. Una estrategia para las inyecciones depot (de liberación lenta) incluye el uso de copolímeros de óxido de polietileno-óxido de polipropileno, en las que el vehículo es fluido a temperatura ambiente y solidifica a la temperatura corporal.

5 Los compuestos farmacéuticos de esta invención pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes farmacéuticos, o con otras terapias anticáncer según se describe en la presente, así como en combinación con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 En una realización, el excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable comprende un lípido para la administración intravenosa. El lípido puede ser un fosfolípido, fosfatidilcolinas sintéticas, fosfatidilcolinas naturales, esfingomiélin, ceramidas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilgliceroles, ácidos fosfatídicos, colesterol, sulfato de colesterol, y lípidos conjugados de hapteno y PEG. El lípido puede estar en forma de una nanoemulsión, micelas, emulsiones, suspensiones, nanosuspensiones, niosomas o liposomas. En una realización, el excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable está en forma de una emulsión micelar, suspensión, o suspensión de nanopartículas, y comprende también una proteína intravenosamente aceptable, por ejemplo, albúmina humana o uno de sus derivados, para la administración intravenosa.

15 En una realización, el excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable comprende un material ceroso para la administración oral. El material ceroso puede ser mono-, di- o triglicéridos, mono- o diésteres de ácidos grasos de PEG, vitamina E conjugada con PEG (TPG de vitamina E) y/o Gelucire. El Gelucire puede seleccionarse de Gelucire 44/14, Gelucire 43/01, Gelucire 50/02, Gelucire 50/13, Gelucire 37/02, Gelucire 33/01, Gelucire 46/07, y Gelucire 35/10. En una realización, el excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable se selecciona de capriol, transcutool hp, labrafil M, labrasol, triacetina, Pharmasolv, etanol, polivinilpirrolidina, carboximetilcelulosa, Tween 20, y Tween 80. En una realización, el excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, Gelucire 44/14, se mezcla con un tensioactivo, que puede ser Tween 80 o Tween 20. Estas realizaciones de las composiciones farmacéuticas pueden formularse también para la administración oral.

25 El compuesto de la invención puede sintetizarse empleando materiales de partida disponibles en el mercado y procesos muy conocidos por los expertos en la técnica de la química orgánica. En los ejemplos 8-10, la presente descripción proporciona un proceso de fabricación de algunos de los compuestos reivindicados.

30 Según una o más realizaciones de la presente descripción, un inhibidor de Stat3 de molécula pequeña se refiere cualquier fármaco de bajo peso molecular que muestre una actividad inhibidora contra Stat3. Comparadas con los productos farmacéuticos de peso molecular mayor, tales como proteínas, péptidos y carbohidratos, las moléculas pequeñas pueden penetrar con más facilidad las membranas celulares y la barrera hematoencefálica. Estas moléculas tienden a incurrir en costes menores de fabricación y de desarrollo del proceso.

35 Según una o más realizaciones de la presente descripción, una terapia de ARNi es el uso directo de ARN de interferencia (ARNi) en el tratamiento de enfermedades, mediante el silenciamiento de genes que generan proteínas malas y, por tanto, una enfermedad. El ARNi es un proceso que aparece en la naturaleza que suprime cierta actividad génica en las células vivas. Es una función eucariota ampliamente conservada que activa el ARN bicatenario en las células a través de intermediarios de dúplex de ARN cortos, tales como ARN de interferencia pequeños (ARNsi). A través de una serie de etapas de procesamiento, una de las dos hebras del ARNsi forma complejos con proteínas para formar RISC (complejo silenciador inducido por ARN). El RISC reconoce la secuencia de ARN complementaria mediante apareamiento de bases de Watson y Crick y después la rompe. El ARNi también incluye ARNsh, ARNm i y otros.

40 Según una o más realizaciones de la presente descripción, una terapia antisentido es una forma de tratamiento para infecciones o trastornos genéticos. Cuando se sabe que la secuencia genética de un gen concreto es la causante de una enfermedad concreta, es posible sintetizar una hebra de ácido nucleico (ADN, ARN o un análogo químico) que se una al ARN mensajero (ARNm) producido por este gen y lo inactive, "desactivando" este gen con eficacia. Esto es debido a que el ARNm debe ser monocatenario para que pueda traducirse. Este ácido nucleico sintetizado se denomina un oligonucleótido "antisentido", porque su secuencia de bases es complementaria con el ARN mensajero (ARNm) del gen, que se denomina la secuencia "sentido" (de modo que un segmento sentido de ARNm "5'-AAGGUC-3'" puede ser bloqueado por el segmento de ARNm antisentido "3'-UCCAG-5'").

50 Según una o más realizaciones de la presente descripción, un peptidomimético es una cadena similar a una proteína pequeña diseñada para imitar a un péptido. Generalmente surgen de la modificación de un péptido existente para alterar las propiedades de la molécula. Por ejemplo, pueden generarse de modificaciones para cambiar la estabilidad o la actividad biológica de la molécula. Esto puede desempeñar un papel en el desarrollo de compuestos similares a fármacos a partir de péptidos existentes. Estas modificaciones implican cambios en el péptido que no se producirían en la naturaleza (tales como esqueletos alterados y la incorporación de aminoácidos no naturales).

55 Según una o más realizaciones de la presente descripción, los inhibidores oligodesoxinucleotídicos de cuarteto-G son moléculas de ADN catalíticas (ADNzimas) diseñadas para inhibir proteínas independientes de su actividad de ruptura de ARN en células.

**Materiales y métodos**

## Ensayos biológicos

Los compuestos de la presente invención pueden ensayarse según el protocolo descrito anteriormente. La tabla 2 muestra la lista de compuestos descritos en el protocolo.

5 Tabla 2

Nombre del compuesto	Código del compuesto
2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona	301
2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona	416
2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona	418
2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona	401
2-etilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona	101
mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil]éster del ácido fosfórico	4011
1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico	4012

10 **Cultivos celulares:** Las células HeLa, DU145, H1299, DLD1, SW480, A549, MCF7, LN18, HCT116, HepG2, Paca2, Panc1, LNCap, FaDu, HT29, y PC3 (ATCC, Manassas, VA) se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA) y penicilina al 5%/estreptomina/anfotericina B (Invitrogen).

15 **Células satélite de Hoechst:** Para identificar y aislar las fracciones de las células satélite (SP) y de células no satélite, se retiraron células SW480 de la placa de cultivo con tripsina y EDTA, se sedimentaron mediante centrifugación, se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron a 37 °C en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía FBS al 2% y HEPES 1 mM. Las células después se marcaron con Hoechst 33342 (Invitrogen) a una concentración de 5 µg/ml. Las células marcadas se incubaron durante 120 minutos a 37 °C, solas o con verapamilo 50 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis). Después de la tinción, las células se suspendieron en disolución salina equilibrada de Hank (HBSS, Invitrogen) que contenía FBS al 2% y HEPES 1 mM, se hacen pasar a través de un filtro de malla 40 µm, y se mantienen a 4 °C hasta el análisis de la citometría de flujo. El tinte de Hoechst se excita a 350 nm y su fluorescencia se mide a dos longitudes de onda empleando un filtro óptico 450 DF10 (filtro de paso de banda de 450/20 nm) y 675LP (filtro de borde paso largo de 675 nm). La ventana de análisis de la dispersión lateral y hacia delante no fue rigurosa, y solo se excluyeron los residuos [15].

25 **Aislamiento de CSC con marcadores de la superficie:** La clasificación de las células tumorales basándose principalmente en la expresión diferencial de los marcadores de la superficie, tales como CD44 o CD133, ha sido la responsable de la descripción de la mayoría de las CSC altamente tumorigénicas hasta la fecha. El aislamiento de CD133 se basa en el método de Ricci-Vitiani *et al.* [20], con una ligera modificación. Las células CD133<sup>+</sup> se aislaron mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) o una separación basada en nanopartículas magnéticas. Brevemente, 10<sup>7</sup> células/ml se marcaron con CD133/1 (AC133)-PE para la clasificación de células basada en FACS, o con CD133/1 (AC133)-biotina (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) para la separación basada en campos magnéticos empleando el kit de selección de biotina EasySep® (Miltenyi Biotec) según las recomendaciones del fabricante. El marcaje no específico se bloqueó con el reactivo de bloqueo de FcR suministrado y se realizaron las incubaciones con anticuerpos (1:11) sobre hielo durante 15 minutos en PBS con FBS al 2% y EDTA 1 mM. Se realizaron cinco lavados para el aislamiento con EasySep®, mientras que las células se sedimentaron a 400 x g durante 5 minutos y se resuspendieron a 2 x 10<sup>7</sup>/ml antes de la clasificación mediante FACS.

40 Las células CD44<sup>high</sup> se aislaron mediante FACS según los métodos descritos en Ponti *et al.*, con una ligera modificación [85]. Brevemente, después de la tripsinización y la recuperación de las células durante 30 minutos a 37 °C en medio de crecimiento, las células se sedimentaron a 400 x g y se resuspendieron en PBS con FBS al 2% y EDTA 1 mM a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml. Las células después se incubaron sobre hielo con una disolución 1:100 de CD44-FITC (BD Biosciences, San Diego, CA) durante 15 minutos. Como alternativa, se utilizó CD24-PE (BD Biosciences, San Diego, CA) (1:100) para la selección negativa. Después de lavar tres veces, las células se resuspendieron a 2 x 10<sup>6</sup>/ml y se hicieron pasar a través de un tamiz de 40 µm.

**Ensayo de esferas:** Un método fiable para medir la capacidad autorrenovadora de una población celular es la capacidad de ser cultivadas como esferas en ausencia de suero o fijación. Se cultivaron células madre del cáncer satélite de Hoechst o CD44<sup>high</sup> FaDu en placas de fijación ultrabaja en medio de células madre del cáncer (DMEM/F12, suplemento neurobasal B27, EGF 20 ng/ml, FGF 10 ng/ml, insulina 4 µg/ml y BSA al 0,4%) para permitir la formación de esferas. Generalmente, la formación de esferas se evalúa mediante microscopía después de 10-14 días en cultivo y se puntúan las esferas con >50 células.

**Ensayo indicador de luciferasa:** Se cotransfectaron células HeLa con un vector indicador de luciferasa-Stat3 (Stat3-Luc) (Panomics, Fremont, CA) y luciferasa de *Renilla* (Promega, Madison, WI) utilizando lipofectamina 2000, según describe el fabricante (Invitrogen). Después de la transfección, las células se mantuvieron en medio que contenía FBS al 0,5% durante 24 horas. Las células después se trataron con el compuesto indicado durante 30 minutos antes de la adición de oncostatina M (OSM) 25 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN) al medio. Seis horas después de la adición de OSM, las células se recolectaron y se midieron los niveles de luciferasa de luciérnaga y de *Renilla* utilizando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo, según describe el fabricante (Promega).

**Análisis de la apoptosis:** Las células tratadas o no tratadas con el compuesto se recolectaron 5 horas después del tratamiento para la tinción con anexina-V. Las células recogidas se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón que contenía anexina-V-FITC y se tiñeron según las instrucciones del fabricante (Roche). Se determinaron las células positivas a anexina-V mediante una citometría de flujo.

**Ensayo de unión de ADN de Stat3:** Se realizó un ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA) según describe el fabricante (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE). Brevemente, se prepararon extractos nucleares a partir de células HeLa empleando el kit de extracción de proteínas NucBuster, según describe el fabricante (EMD Biosciences, San Diego, CA). Se preincubaron 5 µg del extracto nuclear con la dosis indicada del compuesto indicado durante 30 minutos, antes de una incubación durante 15 minutos con el oligonucleótido de Stat3 consenso marcado con IR700. Las muestras después se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida y directamente se escanearon utilizando el sistema de formación de imágenes de infrarrojo Odyssey (Li-Cor Biosciences). Para el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), se preincubaron 5 µg del extracto nuclear con la concentración indicada del compuesto indicado durante 30 minutos antes de la adición del oligo biotinilado (5'-biotina-GATCCTTCTGGGAATTCCTAGATC-3', SEQ ID NO:1). Después los complejos de ADN-Stat3 se capturaron en placas de 96 pocillos revestidas con estreptavidina (Pierce, Rockford, IL). Los complejos unidos después se incubaron con anticuerpo policlonal de Stat3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), seguido de un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-conejo (GF Healthcare, Pittsburgh, PA). El anticuerpo unido después se visualizó mediante la adición de sustrato de TMB (Pierce) y se midió la absorbancia a 450 nm.

**Determinación de la viabilidad celular:** Para el análisis de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a 10.000 células por pocillo. Veinticuatro horas después del cultivo en placa, se añadió el compuesto a las células en las dosis indicadas. Veintidós horas después de la adición del compuesto se añadió MTT a cada pocillo (0,5 mg/ml, concentración final) y las placas se incubaron durante 2 horas más a 37 °C. Después el medio se aspiró y el producto de formazano se solubilizó en 100 µl de alcohol isopropílico. Se midió la absorbancia de cada pocillo a 570 nm utilizando un lector de microplacas.

**Inmunofluorescencia:** Las células tratadas con el compuesto indicado durante el tiempo indicado se fijaron en formaldehído al 4% o metanol frío para la detección de la anexina-V, la caspasa 3 rota, o Stat3, respectivamente. Los cubreobjetos se secaron al aire y se rehidrataron en PBS a temperatura ambiente durante 10 min. Después las muestras se incubaron en tampón de bloqueo (PBS, FBS al 5%) durante 10 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Las células se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios. Después de lavar, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:500 de anticuerpo anti-conejo conjugado con FITC. Se capturaron imágenes con un microscopio Nikon TE200 equipado con epifluorescencia y una cámara CCD de mosaico SPOT. El anticuerpo anti-caspasa 3 rota policlonal (1:100) se obtuvo en Cell Signaling Technology, Danvers, MA. La anexina-V-FITC se obtuvo en Roche, Penzberg, Alemania. El anticuerpo anti-Stat3 policlonal se obtuvo en Santa Cruz.

**Inactivación de genes mediante la tecnología TPIV®:** La tecnología TPIV® (Therapeutic Pathway Identification and Validation) (Boston Biomedical Inc., Norwood, MA, EEUU) proporciona plásmidos que pueden emplearse para transfectar en primer lugar bacterias que, a su vez, son captadas por un sujeto mamífero. Después de la lisis bacteriana, el ARNbc codificado por los plásmidos TPIV® y procesado por las bacterias se libera al citoplasma de la célula de mamífero y realiza la inactivación de genes dirigida. La tecnología de TPIV® se describe en la solicitud de patente PCT de propiedad de los solicitantes n.º PCT/US08/68866, presentada el 30 de junio de 2008.

De modo específico, se construye un plásmido TPIV® que codifica secuencias de ARNsi eficaces contra Stat3 mediante clonación con PCR de un plásmido de Stat3 obtenido en Origene Technologies (Rockville, MD, EEUU) utilizando los siguientes cebadores:

**TPIV-Stat3 (inserción de 300 pb)**

Cebadores:

Stat3 TPIV directo 5'-GGATCTAGAATCAGCTACAGCAGC (SEQ ID NO:2)

Stat3 TPIV inverso 5'-TCCTCTAGAGGGCAATCTCCATTG (SEQ ID NO:3).

- 5 El plásmido control se construyó utilizando un plásmido pGL2 obtenido en Promega (Madison, WI, EEUU).

**TPIV-GL2 (inserción de 300 pb)**

Cebadores:

GL2 TPIV directo 5'- C CCTCTAGATGGTTCTGGAAC (SEQ ID NO:4)

GL2 TPIV inverso 5'-GCTCTAGAAACCCCTTTTGG (SEQ ID NO:5)

- 10 Bacterias de *E. coli* BL21 (DE3) pLYSe (50-100  $\mu$ l) químicamente competentes se transformaron con un control o 100 ng de plásmido TPIV<sup>®</sup> dirigido a Stat3 según las instrucciones del fabricante (Stratagene). Después se inoculó una única colonia en medio BHI que contenía ampicilina 100  $\mu$ g/ml y se cultivó durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, 5 ml de cada cultivo desarrollado durante la noche se diluyó 1:40 en medio BHI fresco que contenía ampicilina 100  $\mu$ g/ml y se cultivó durante 2-4 horas más (hasta DO<sub>600</sub> = 0,5). Cada cultivo después se trató con IPTG (concentración final 1 mM) durante 2-4 horas para inducir la transcripción de los ARN bicatenarios largos que pueden ser procesados en un cóctel de ARNsi por las bacterias. Después de la inducción con IPTG, se calculó el número total de bacterias en cada cultivo midiendo el valor de DO<sub>600</sub> ( $8 \times 10^8$  bacterias/ml de cultivo presenta una DO<sub>600</sub> = 1). Entonces se calculó el número de bacterias para cada tratamiento celular según la confluencia celular y la multiplicidad de infección necesaria (MOI, intervalos de prueba de 20:1 a 2000:1, bacterias a células) en un volumen de reacción apropiado. Por regla general, debe elegirse el volumen de reacción que produzca  $3 \times 10^8$ /ml para 1000:1 MOI. El volumen requerido de cultivo de bacterias después se centrifugó a 2500 g durante 10 min a 4 °C y el sedimento se lavó una vez con medio de cultivo sin suero que se emplea para que las células se bactoefecten, más ampicilina 100  $\mu$ g/ml e IPTG 1 mM, y se resuspende en el mismo medio a la densidad requerida para la infección bacteriana (bactofección).
- 15
- 20
- 25 Al mismo tiempo, se aíslan células de cáncer o células madre del cáncer. Treinta minutos antes de la bactofección, el medio de cultivo celular se reemplaza por 2 ml de medio sin suero fresco que contenía ampicilina 100  $\mu$ g/ml e IPTG 1 mM. Las bacterias preparadas anteriormente después se añadieron a las células a la MOI deseada durante 2 horas a 37 °C.
- 30 Después del periodo de infección, las células se lavaron 3 veces utilizando el medio de cultivo celular sin suero. Las células después se incubaron con 2 ml de medio de cultivo celular completo fresco que contenía ampicilina 100  $\mu$ g/ml y gentamicina 150  $\mu$ g/ml durante 2 horas para matar a las bacterias extracelulares remanentes. Después del tratamiento con ampicilina y gentamicina, las células se incubaron con 3 ml de medio RPMI 1604 completo fresco que contenía ofloxacina 10  $\mu$ g/ml para matar a las bacterias intracelulares. Las células después se recolectaron o se analizaron en diversos momentos para evaluar el grado de silenciamiento del gen diana y los fenotipos resultantes.
- 35 **Evaluaciones *in vivo*:** También se realizaron exámenes diarios del estado de salud de cada animal. Se comprobaron los pesos corporales cada tres días. Se suministró alimento y agua a diario según los procedimientos de mantenimiento de animales de la instalación. El tratamiento que produjo >20% de letalidad y/o >20% de pérdida de peso corporal neto se considera tóxico. Los resultados se expresan como promedio del volumen tumoral (mm<sup>3</sup>)  $\pm$  SE. Se considera que unos valores de P < 0,05 son estadísticamente relevantes.
- 40 **Mantenimiento de los animales:** Ratones *nude* atímicos machos o hembras de 4-5 semanas (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) se aclimataron a las instalaciones de mantenimiento de animales durante al menos 1 semana antes del inicio del estudio. Todos los procedimientos experimentales utilizados fueron coherentes con las directrices indicadas por the American Physiology Society and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, y también aprobadas por the Institutional Animal Care and Use Committee of Boston Biomedical Inc. Los animales se alojaron en grupos de cuatro en jaulas con lecho de virutas en una habitación con temperatura controlada (20 °C-22,2 °C), luz controlada (ciclo de luz-oscuridad de 12 horas) y humedad controlada (45-55%). Los animales pudieron acceder al alimento y al agua sin restricciones durante el experimento.
- 45
- 50 **Sistema del modelo de ratón *nude*-intraesplénico (modelo ISMS):** Ratones *nude* hembras se anestesiaron y, bajo condiciones asépticas, se realizó una incisión en el flanco izquierdo para exponer el bazo. Se inyectaron 10<sup>6</sup> células HT29 de cáncer de colon humano en 0,1 ml de PBS bajo la cápsula del bazo utilizando una aguja de calibre 27. El bazo volvió a introducirse en la cavidad peritoneal y se cerró la incisión. El tratamiento comenzó al día siguiente de la implantación hasta el día del examen. El régimen de tratamiento fue de 5qd/semanal por ruta IP. Los ratones se sacrificaron cuando estaban moribundos o 30 días después de la inyección. Se retiraron y estudiaron el bazo y el hígado, y se registró el número de lesiones tumorales.

**Ejemplo 1: Identificación de Stat3 como diana contra células madre del cáncer**

La inactivación de Stat3 en CSC induce la apoptosis. Para determinar si las células madre del cáncer expresan Stat3 y si Stat3 está constitutivamente activa, los inventores realizaron una microscopía de inmunofluorescencia, que permite no solo el análisis de poblaciones celulares escasas, sino que también proporciona información adicional sobre la localización de proteínas y la capacidad de correlacionar la tinción con el fenotipo (concretamente, la apoptosis). Después de la detección inmunofluorescente de p-Stat3 y Stat3 en células NSP y SP aisladas mediante FACS de células de cáncer de colon SW480, se determinó que Stat3 en efecto estaba presente en células SP y que se encontraba modestamente enriquecida en el núcleo (figura 3A). Además, también se observó una mayor tinción de p-Stat3 en las células SP frente a las células NSP, lo cual sugiere que las células SP pueden depender más de Stat3 para la supervivencia.

El estado de la Stat3 también se evaluó en células CD133<sup>+</sup> aisladas a partir de células de cáncer de cabeza y cuello humano FaDu y células de glioblastoma humano LN18. Tal como se muestra en la figura 3B, Stat3 también se encuentra constitutivamente activa en estas células. Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que Stat3 es una diana particularmente importante para las células madre del cáncer.

Después se ensayó el efecto de la inactivación de Stat3 en CSC utilizando TPIV<sup>®</sup>. El análisis de inmunofluorescencia reveló que puede lograrse una significativa disminución de Stat3 a las 24 horas de la infección (figura 4A) en CSC recién aisladas (SP) y se descubrió que la mayoría de las células tratadas con plásmidos TPIV<sup>®</sup> dirigidos a Stat3 sufrieron apoptosis a las 24 horas de la infección, mientras que los plásmidos TPIV<sup>®</sup> control no indujeron la apoptosis por encima de los niveles de las células no infectadas control (figura 4B). Estos datos demuestran que las células madre del cáncer dependen de Stat3 para la supervivencia.

**La inactivación de Stat3 en CSC inhibe la esferogénesis de CSC:** Se aislaron células madre del cáncer satélite de Hoeschst o FaDu CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> mediante FACS, y se cultivaron en placas de fijación ultrabaja en medio de células madre del cáncer (DME/F12, suplemento neurobasal B27, EGF 20 ng/ml, FGF 10 ng/ml, insulina 4 µg/ml y BSA al 0,4%) para permitir la formación de esferas. Las esferas primarias se recogieron, se disgregaron con tripsina y se distribuyeron en placas de 96 pocillos de fijación ultrabaja antes del tratamiento con TPIV<sup>®</sup>. Las bacterias se administraron a una MOI de 1000 durante dos horas antes de la adición de un cóctel de antibióticos (penicilina/estreptomicina, gentamicina, oflazacina). La formación de esferas se evaluó después de 10-14 días en cultivo. Se capturaron imágenes representativas de las esferas antes (figura 5, panel izquierdo superior) o después de la adición de azul de tripano para identificar a las células muertas (figura 5, panel inferior izquierdo). La esferogénesis relativa se muestra en el panel derecho de la figura 5. Los datos claramente demuestran que la inactivación de Stat3 en células madre del cáncer inhibe la esferogénesis, lo cual demuestra que Stat3 es un factor de autorrenovación clave de las células madre del cáncer.

**Ejemplo 2: Identificación de compuestos que inhiben la actividad de la ruta de Stat3**

**Inhibición de la actividad de transcripción de Stat3:** Los compuestos se ensayaron para su capacidad de inhibir la actividad de activación de la transcripción de Stat3 en células utilizando una construcción indicadora de Stat3-luciferasa (Stat3-luc). Se cultivaron células transfectadas con Stat3-luc en medio con menor cantidad de suero antes de la adición del compuesto indicado durante 30 minutos. Las células después se estimularon con oncostatina M (OSM) 25 ng/ml durante 6 horas, seguido de la detección de la actividad indicadora de Stat3-luc. La incubación de las células con el compuesto 401 inhibe la actividad indicadora de Stat3 estimulada por OSM (figura 6, panel izquierdo). Se incluyó AG490, un inhibidor conocido de la ruta de Jak-Stat, como control positivo para la inhibición de Stat3. El etopósido, que se incluyó como control para la actividad genotóxica, mostró poca o ninguna inhibición de Stat3. El compuesto 1001, que es un naftaleno en lugar de una naftoquinona, como los compuestos en esta invención, no inhibió la actividad indicadora de Stat3 estimulada por OSM incluso a una concentración mucho mayor (figura 6, panel derecho).

Se ensayaron otros compuestos en los ensayos de indicador de Stat3-luciferasa, y los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3

Compuesto n.º	IC <sub>50</sub> en los ensayos de Stat3-Luc
401	aprox. 0,25 µM
416	aprox. 0,75 µM
418	aprox. 0,75 µM
301	aprox. 2 µM

**Inhibición de la actividad de unión al ADN de Stat3:** Se emplearon extractos nucleares de células HeLa, que contienen Stat3 constitutivamente activada según se detecta mediante fosforilación en el resto tirosina 705, para realizar un EMSA de Stat3 para controlar la actividad de unión al ADN de Stat3. Se incubaron extractos nucleares con el compuesto indicado antes de la incubación con un oligonucleótido consenso de Stat3 marcado con IR700. La unión de Stat3 al oligonucleótido se controló mediante una electroforesis en gel y una detección empleando un escáner de infrarrojo LiCor Odyssey. Se identificó la banda retrasada de Stat3 y se confirmó mediante un superdesplazamiento con el anticuerpo anti-Stat3 (figura 7A, panel izquierdo) y la inhibición dependiente de la dosis con el péptido Stat3 (figura 7A, panel intermedio). Se observó la inhibición dependiente de la dosis de la unión al ADN de Stat3 después de una incubación de la sonda marcada con el compuesto 401 (figura 7A, panel derecho).

Se ensayaron otros compuestos en los ensayos de EMSA. Tal como se muestra en la figura 7B, los compuestos 401, 416 y 418 pueden inhibir la unión al ADN de Stat3.

**Inhibición de los efectores corriente abajo de Stat3 en tejidos de tumor de xenoinjerto:** Se prepararon extractos de tumores Paca2 xenoinjertados que fueron tratados con el compuesto 401 o un control de vehículo 4 horas antes de la recolección. Las muestras se analizaron mediante transferencias Western y EMSA para evaluar el nivel de expresión de los efectores corriente abajo de Stat3 y la actividad de unión al ADN de Stat3. La muestra tratada con el compuesto 401 (T) mostró una disminución en la actividad de unión al ADN de Stat3 frente al control (V) (figura 8A). Además, el tratamiento con el compuesto 401 produjo una disminución en el nivel de expresión de los efectores corriente abajo de Stat3 ciclina D1 y survivina (figura 8B).

### Ejemplo 3: Identificación de compuestos que se dirigen a las células madre del cáncer

**Identificación de compuestos que son apoptóticos para células madre del cáncer:** Puesto que se ha demostrado que las células madre del cáncer expelen activamente a Hoechst, se tiñeron células SW480 con Hoechst y se extrajeron las células satélite (mostrado en la figura 9A, área delimitada en el panel izquierdo) para enriquecer las células madre del cáncer. Para confirmar que estas células satélite está enriquecida con células madre del cáncer, primero se trató un conjunto control de células SW480 con verapamilo, un inhibidor de los transportadores de ABC, antes de teñir con Hoechst. Tal como se muestra en el panel derecho de la figura 9A, el tratamiento con verapamilo produce la pérdida de las células satélite.

Se determinó la IC<sub>50</sub> del compuesto 401 contra las células satélite de Hoechst en los ensayos MTT y se comparó con la IC<sub>50</sub> contra las células no satélite. Los resultados demuestran que las células satélite son tan sensibles como las células no satélite al compuesto 401 (figura 9B, paneles derechos). Sin embargo, las células satélite son mucho más resistentes que las células no satélite a la doxorubicina (figura 9B, paneles izquierdos), lo cual resulta coherente con las publicaciones previas [7, 86]. Estos datos sugieren que el compuesto 401 mata a las células madre del cáncer.

Las células satélite de Hoechst se trataron con el compuesto 401 y se determinó el modo de la muerte celular mediante tinción con anexina V (un marcador temprano de la apoptosis). Los resultados demuestran que las células moribundas son positivas a anexina V (figura 10A), lo cual demuestra que el compuesto 401 es apoptótico para las células madre del cáncer.

Como alternativa, se realizó una extracción con esferas magnéticas de anticuerpo de CD133 (uno de los marcadores habituales de la superficie de las células madre del cáncer) para enriquecer las células madre del cáncer. Las células CD133<sup>+</sup> después se trataron con el compuesto 401, seguido de una tinción con un anticuerpo contra la caspasa 3 rota (una característica de la apoptosis). Tal como se muestra en la figura 10B, muchas de las células CD133<sup>+</sup> se convierten en positivas a caspasa 3 rota después de un tratamiento con el compuesto 401, lo cual corrobora que el compuesto 401 es apoptótico para las células madre del cáncer.

Además, se ensayaron las actividades de varios otros compuestos contra las células madre del cáncer. Brevemente, CSC recién aisladas (células Hoechst SP SW480 o células FaDu CD44<sup>high</sup>) se expusieron a un intervalo de dosis (30-0,117 μM) del compuesto durante 48 h antes de estudiar la viabilidad celular mediante un ensayo MTT. Se calcularon las IC<sub>50</sub> representando gráficamente el porcentaje de células supervivientes. Tal como se muestra en la tabla 4 y la tabla 5, los compuestos de la presente invención pueden dirigirse a las células madre del cáncer.

Tabla 4

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)	
	NSP	SP
401	0,33	0,34
418	0,33	0,34
4011	0,34	0,38
4012	0,81	0,57

Tabla 5

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)	
	CD44 <sup>low</sup>	CD44 <sup>high</sup>
4011	0,42	0,27
4012	0,76	1,05

5 **Identificación de los compuestos que inhiben la esferogénesis de CSC *in vitro*:** Una de las características de las células madre del cáncer es su capacidad para autorrenovarse [87]. Un método fiable para medir la capacidad de autorrenovación de poblaciones celulares es la capacidad de ser cultivadas como esferas en ausencia de suero o fijación [88]. Para comparar la capacidad del compuesto 401 frente a otros agentes dirigidos y quimioterapéuticos, se cultivaron CSC CD44<sup>high</sup> aisladas con FACS como esferas durante 72 horas antes de exponerse a un panel de agentes terapéuticos. De los agentes ensayados, solo el compuesto 401 resultó eficaz para prevenir la proliferación de esferas (figura 11). Nótese que las esferas fueron resistentes a doxorubicina y docetaxel, a pesar de ser aplicados a aproximadamente diez veces sus concentraciones IC<sub>50</sub> para la muerte celular en ensayos similares. Se añadieron Tarceva, Sutent y Gleevec a aproximadamente tres veces sus concentraciones terapéuticas indicadas. Estos demuestra que aunque las células madre del cáncer son resistentes a agentes quimioterapéuticos y dirigidos convencionales, el compuesto 401 es muy eficaz para inhibir su crecimiento.

15 **Identificación de compuestos que inhiben la esferogénesis de CSC *in vivo*:** Se obtuvieron ratones nu/nu atímicos hembra de 6 semanas de edad en Charles River Labs (Wilmington, MA). A los ratones se les inyectaron por ruta subcutánea en el flanco 6 x 10<sup>6</sup> células de cáncer FaDu o Paca2 en 0,2 ml de DMEM sin suero. Después de que los xenoinjertos alcanzasen un tamaño de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>, los animales que portan los tumores del xenoinjerto Paca2 fueron administrados con vehículo, gemcitabina (120 mg/kg, dos veces semanales) o el compuesto 401 (20 mg/kg) por ruta IP durante una semana, y los animales que portan los tumores del xenoinjerto FaDu fueron administrados a diario con vehículo, carboplatino (30 mg/kg) o el compuesto 401 (20 mg/kg) por ruta IP durante dos semanas antes del sacrificio. Después, los tumores después se recogieron para las células Paca2 y FaDu, respectivamente. Se obtuvieron suspensiones de células individuales después del sacrificio de los animales y la retirada estéril de los tumores. Brevemente, los tumores se trituraron finamente con escalpelos estériles en trozos de 0,1 mm<sup>3</sup> antes de ser digeridos en colagenasa 1 mg/ml/HBSS durante 15-30 minutos con agitación constante. Después de hacer pasar las células a través de un filtro de malla 40 μm se retiraron los eritrocitos, las células muertas y los restos celulares extendiendo la suspensión celular sobre 1 ml de Histopaque y recogiendo la capa de interfase después de una centrifugación a 1440 x g durante 30 minutos. Después se contaron las células vivas y se emplearon para medir su capacidad para formar esferas. Las células se distribuyeron en placas de 96 pocillos de fijación ultrabaja a una densidad de 100 células por pocillo en medio de células madre del cáncer (DMEM/F12, suplemento neurobasal B27, EGF 20 ng/ml, FGF 10 ng/ml, insulina 4 μg/ml y BSA al 0,4%). Se añadió medio fresco cada tres días y se determinó la formación de esferas después de 10-14 días en cultivo. Se puntuaron las esferas con >50 células. Cuando finalizó el experimento se añadió azul de tripano para identificar las células muertas. Tal como se muestra en la figura 12, las quimioterapias convencionales de gemcitabina (panel superior) y carboplatino (panel inferior) enriquecieron las células madre del cáncer, según se evidenció por una mayor esferogénesis. Por contraste, los tratamientos con el compuesto 401 disminuyeron las células madre del cáncer, según se evidenció por una menor esferogénesis.

#### **Ejemplo 4: Identificación de los compuestos que destruyen selectivamente un amplio espectro de células del cáncer**

40 **Identificación de los compuestos que son apoptóticos para un amplio espectro de células del cáncer *in vitro*:** Células cultivadas en placas de 96 pocillos y tratadas con los compuestos indicados se sometieron a un análisis MTT a las 24 horas después del tratamiento con el compuesto para determinar la viabilidad celular. Los valores de IC<sub>50</sub> calculados en múltiples líneas celulares se resumen en la siguiente tabla 6. Los datos demuestran que estos compuestos tienen una potente actividad contra un amplio espectro de células del cáncer.

Tabla 6

Línea celular	Tejido	IC <sub>50</sub> (μM)						
		4011	4012	101	301	401	416	418
A549	pulmón					0,95	1,90	1,06
H1299	pulmón			3-10	0,794	0,23	0,25	0,34
MCF7	mama					0,46	0,75	0,46
HeLa	cérvix			11,7	3,358	0,43	0,62	0,80
DLD1	colon					0,33	0,54	0,64
SW480	colon					0,32	0,44	0,76
HCT116	colon					0,58	0,69	0,61
HT29	colon					1,27	1,91	1,83
HepG2	hígado					0,25		
Paca2	páncreas	0,446				0,11	0,21	0,21
Panc1	páncreas					1,70	2,59	1,54
DU145	próstata			3,7	0,835	0,12	0,22	0,18
PC3	próstata					2,37	3,10	3,04
LNCap	próstata					0,63		
FaDu	cabeza y cuello	0,353	1,041			0,39		

Además, células DU145 fueron tratadas primero con DMSO o con las concentraciones indicadas del compuesto 401, después se tiñeron con anexina V y después se realizó un análisis de citometría de flujo 5 horas después del tratamiento. Los resultados demuestran que el tratamiento con el compuesto 401 produce un aumento dependiente de la dosis en la tinción de anexina V (figura 13), lo cual demuestra que el compuesto 401 es apoptótico para estas células de cáncer.

**Ejemplos de la selectividad de los compuestos:** Bajo las condiciones de ensayo que producen la muerte de casi todas las células del cáncer, las células normales permanecen sustancialmente viables. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron relativamente resistentes al compuesto 401, y tienen una IC<sub>50</sub> de MTT de 14 μM después de una incubación durante 24 horas con el compuesto 401. Esta IC<sub>50</sub> es entre 6 a 116 veces mayor que la que se observa en una diversidad de líneas de cáncer, lo cual indica una ventana terapéutica razonable comparado con las células de cáncer.

De una manera similar a las PMBC, las células madre hematopoyéticas de la médula ósea CD34<sup>+</sup> no resultaron dañadas cuando se trataron con el compuesto 401. Tal como se muestra en la tabla 7, la incubación de células mononucleares de médula ósea CD34<sup>+</sup> durante 6 horas con el compuesto 401 produjo una IC<sub>50</sub> mayor que 30 μM para los linajes mieloides y eritroides de la médula ósea, mientras que las células de cáncer de próstata DU145 y de colon HT29 presentan unas IC<sub>50</sub> menores que 0,5 μM bajo condiciones similares. Estos datos sugieren una amplia ventana terapéutica (mayor que 50 veces) para el compuesto 401 según los datos *in vitro*.

Tabla 7 - El compuesto 401 es relativamente no tóxico para células madre de médula ósea CD34<sup>+</sup>

IC <sub>50</sub> del compuesto 401 (μM)			
Células normales		Células de cáncer	
Eritroides de ME CD34 <sup>+</sup>	Mieloides de ME CD34 <sup>+</sup>	DU145	HT29
>30	>30	<0,2	<0,5

ME = médula ósea

Comparación de la IC<sub>50</sub> del compuesto 401 en células mononucleares de médula ósea CD34<sup>+</sup>, células DU145 y células FaDu en ensayos de formación de colonias.

#### Ejemplo 5: Eficacia antitumoral *in vivo*

5 **Modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático:** Se inocularon células Paca2 por ruta subcutánea en ratones *nude* atímicos hembra (4 x 10<sup>6</sup> células/ratón). Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 450 mm<sup>3</sup>, los animales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos de cinco ratones por grupo. Los ratones se trataron por ruta intraperitoneal con el compuesto 401 a 20 mg/kg o con el control de vehículo a diario. El compuesto 401 se formuló a 5 mg/ml en lípidos al 1,5% y H<sub>2</sub>O. Los animales recibieron un total de 14 dosis y se dejaron para la observación después del tratamiento. Los tumores se midieron a lo largo del tratamiento y se controlaron durante 22 días más después del tratamiento. Tal como se muestra en el panel izquierdo de la figura 14, el compuesto 401 inhibe fuertemente el crecimiento tumoral. Se calculó que la inhibición del crecimiento tumoral era del 64% en el día 60 y que era estadísticamente significativa (p<0,001). De forma más importante, los volúmenes tumorales se mantuvieron estáticos durante el periodo de 22 días después del tratamiento.

15 En un experimento similar, se inocularon células de cáncer pancreático humano panc-1 por ruta subcutánea en ratones *nude* atímicos hembra (2 x 10<sup>6</sup> células/ratón) y se dejó que formasen tumores palpables. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 60 mm<sup>3</sup>, los animales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos de cinco ratones por grupo. Los ratones se trataron por ruta intraperitoneal (IP) con gemcitabina con el régimen convencional (120 mg/kg una vez cada tres días) o control de vehículo, con un total de 6 dosis de gemcitabina o vehículo de control. Los tumores se midieron a lo largo del tratamiento y se controlaron durante 19 días más después del tratamiento. Tal como se muestra en la figura 14, panel derecho, el tratamiento con gemcitabina como monoterapia inhibe el crecimiento tumoral, con una inhibición del crecimiento tumoral del 47,5% en el día 41. Después de detener el tratamiento, los tumores en el grupo tratado con gemcitabina pronto superaron a los del grupo control.

25 No se observó rebote de los tumores durante el tratamiento con el compuesto 401 ni en el periodo después del tratamiento en el modelo de cáncer pancreático humano Paca-2 xenoinjertado, lo cual resulta coherente con su mecanismo de acción dirigido a las células madre del cáncer. Por contraste, los tumores del xenoinjerto pancreático humano con la actual quimioterapia convencional de gemcitabina respondieron inicialmente, pero rebotaron durante el tratamiento continuo o superaron a los tumores control después de detener la dosificación. La abolición del rebote del tumor diferencia al compuesto 401 de las quimioterapias convencionales y ofrece una posibilidad para mejorar de forma drástica y fundamental la terapia del cáncer.

30 **Modelo de xenoinjerto de cáncer de cabeza y cuello:** Se inocularon células de cáncer de cabeza y cuello humano FaDu por ruta subcutánea en ratones *nude* atímicos hembra (6 x 10<sup>6</sup> células/ratón) y se dejó que formasen tumores palpables. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, los animales se trataron por ruta intraperitoneal (IP) con el compuesto 401 a 20 mg/kg o con el control de vehículo a diario (5 días consecutivos, seguido de un detención de la dosificación de 2 días). El compuesto 401 se formuló a 5 mg/ml en lípidos al 2%, colesterol al 0,1% y H<sub>2</sub>O. Los animales recibieron un total de 15 dosis del compuesto 401 o del control de vehículo. Los tumores se midieron a lo largo del tratamiento. Tal como se muestra en la figura 15, en este modelo de xenoinjerto de cabeza y cuello muy agresivo, en los animales dosificados con el compuesto 401 por ruta intraperitoneal como monoterapia se inhibió fuertemente el crecimiento tumoral. Se calculó que la inhibición del crecimiento tumoral del compuesto 401 era del 75% con un valor p de 0,007. No se produjo un cambio significativo en el peso corporal debido a la administración intraperitoneal del vehículo o del compuesto 401 a 20 mg/kg.

45 **Modelo de xenoinjerto de cáncer de mama:** Se inocularon células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 por ruta subcutánea en ratones *nude* atímicos hembra (8 x 10<sup>6</sup> células/ratón) y se dejó que formasen tumores palpables. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>, los animales se trataron por ruta oral (PO) con el compuesto 401 a 200 mg/kg o con el control de vehículo a diario (5 días consecutivos, seguido de un detención de la dosificación de 2 días). El compuesto 401 se formuló a 20 mg/ml en Gelucire al 8% y vitamina E al 20%. Los animales recibieron un total de 15 dosis del compuesto 401 o del control de vehículo. Los tumores se midieron a lo largo del tratamiento. Tal como se muestra en la figura 16, la dosificación oral del compuesto 401 como monoterapia a 200 mg/kg inhibió fuertemente el crecimiento tumoral. Se calculó que la inhibición óptima del crecimiento tumoral del compuesto 401 era del 66% con un valor p de 0,0068. No se produjo un cambio significativo en el peso corporal debido a la administración PO del vehículo o del compuesto 401 a 200 mg/kg. Estos datos sugieren que el compuesto 401 puede dosificarse con seguridad en un régimen que es eficaz en este modelo de cáncer de mama humano.

55 **Modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata:** Se inocularon células de cáncer de próstata humano PC3 por ruta subcutánea en ratones *nude* atímicos hembra (8 x 10<sup>6</sup> células/ratón) y se dejó que formasen tumores palpables. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, los animales se trataron por ruta intraperitoneal (IP) con el compuesto 401 a 20 mg/kg o con el control de vehículo a diario. El compuesto 401 se formuló a 5 mg/ml en lípidos al 2%, colesterol al 0,1% y H<sub>2</sub>O. Los animales recibieron un total de 30 dosis del compuesto 401 o del control de vehículo. Los tumores se midieron a lo largo del tratamiento. Tal como se muestra en la figura 17, la dosificación IP del compuesto 401 como monoterapia a 20 mg/kg inhibió el crecimiento tumoral. Se calculó que la inhibición óptima del crecimiento tumoral del compuesto 401 era del 55% con un valor p de 0,015. No se produjo un cambio

60

significativo en el peso corporal debido a la administración intraperitoneal del vehículo o del compuesto 401 a 20 mg/kg. Estos datos sugieren que el compuesto 401 puede dosificarse con seguridad en un régimen que es eficaz en este modelo de cáncer de próstata humano.

5 **Modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico:** Se inocularon células de cáncer gástrico humano MKN-45 por ruta subcutánea en ratones *nude* atímicos hembra ( $8 \times 10^6$  células/ratón) y se dejó que formasen tumores palpables. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente  $180 \text{ mm}^3$ , los animales se trataron por ruta oral (PO) con el compuesto 401 a 200 mg/kg o con el control de vehículo a diario. El compuesto 401 se formuló a 20 mg/ml en Gelucire al 8% y vitamina E al 20%. Los animales recibieron un total de 20 dosis del compuesto 401 o del control de vehículo. Los tumores se midieron a lo largo del tratamiento. Tal como se muestra en la figura 18, la dosificación oral del compuesto 401 como monoterapia a 200 mg/kg inhibió el crecimiento tumoral. Se calculó que la inhibición óptima del crecimiento tumoral del compuesto 401 era del 70% con un valor p de 0,01. No se produjo un cambio significativo en el peso corporal debido a la administración oral del vehículo o del compuesto 401 a 200 mg/kg. Estos datos sugieren que el compuesto 401 puede dosificarse con seguridad en un régimen que es eficaz en este modelo de cáncer gástrico humano.

15 **Modelo de xenoinjerto de cáncer hepático:** Se inocularon células de cáncer hepático humano HepG2 por ruta subcutánea en ratones *nude* atímicos hembra ( $8 \times 10^6$  células/ratón) y se dejó que formasen tumores palpables. En este estudio, la dosificación comenzó cuando los tumores alcanzaron aproximadamente  $700 \text{ mm}^3$ . Los animales se trataron por ruta intravenosa (IV) con el compuesto 401 a 10 mg/kg o con el control de vehículo a diario. El compuesto 401 se formuló a 2 mg/ml en albúmina al 1,5%. Los animales recibieron un total de 10 dosis del compuesto 401 o del control de vehículo. Los tumores se midieron a lo largo del tratamiento. Tal como se muestra en la figura 19, aunque el tratamiento comenzó a un estadio mucho más tardío del crecimiento tumoral, el tratamiento IV con el compuesto 401 como monoterapia a 10 mg/kg todaruta podía inhibir fuertemente el crecimiento tumoral. Se calculó que la inhibición óptima del crecimiento tumoral del compuesto 401 era del 52,3% con un valor p de 0,05. No se produjo un cambio significativo en el peso corporal debido a la administración IV del vehículo o del compuesto 401 a 10 mg/kg. Estos datos sugieren que el compuesto 401 puede dosificarse con seguridad en un régimen que es eficaz en este modelo de cáncer hepático humano.

#### Ejemplo 6: Eficacia antimetástasis

El compuesto 401 también se ensayó para determinar su capacidad para inhibir la metástasis en un modelo ISMS. El sistema del modelo de ratón *nude*-intraesplénico (ISMS) es apropiado para los estudios del comportamiento maligno de carcinomas colorrectales, puesto que esta técnica puede producir metástasis experimentales en el hígado. En este modelo, se inyectaron un millón de células HT29 en 0,1 ml de PBS bajo la cápsula del bazo de los ratones *nude*. El bazo volvió a introducirse en la cavidad peritoneal y se cerró la incisión. Los ratones se sacrificaron cuando estaban moribundos o 30 días después de la inyección. Se retiraron y estudiaron el bazo y el hígado, y se registró el número de lesiones tumorales. Los ratones se dividieron en dos grupos, un grupo control que había recibido vehículo ( $n = 4$ ) y el otro grupo, que recibió el compuesto 401 20 mg/kg ( $n = 4$ ). El fármaco se administró por ruta IP a 5 días/semana, comenzando desde el día 2 al día 30 después de la inyección IS. Se calculó el número de tumores primarios y tumores hepáticos metastásicos con un microscopio. En la figura 20 se muestran fotografías representativas. En el grupo control de vehículo se aprecia una gran carga de tumores primarios en el bazo (figura 20, panel superior izquierdo). También se observaron metástasis hepáticas espontáneas masivas (figura 20, panel superior derecho). Los tratamientos con el compuesto 401 redujeron significativamente el número de focos de tumor primario y la metástasis hepática espontánea (figura 20, paneles inferiores).

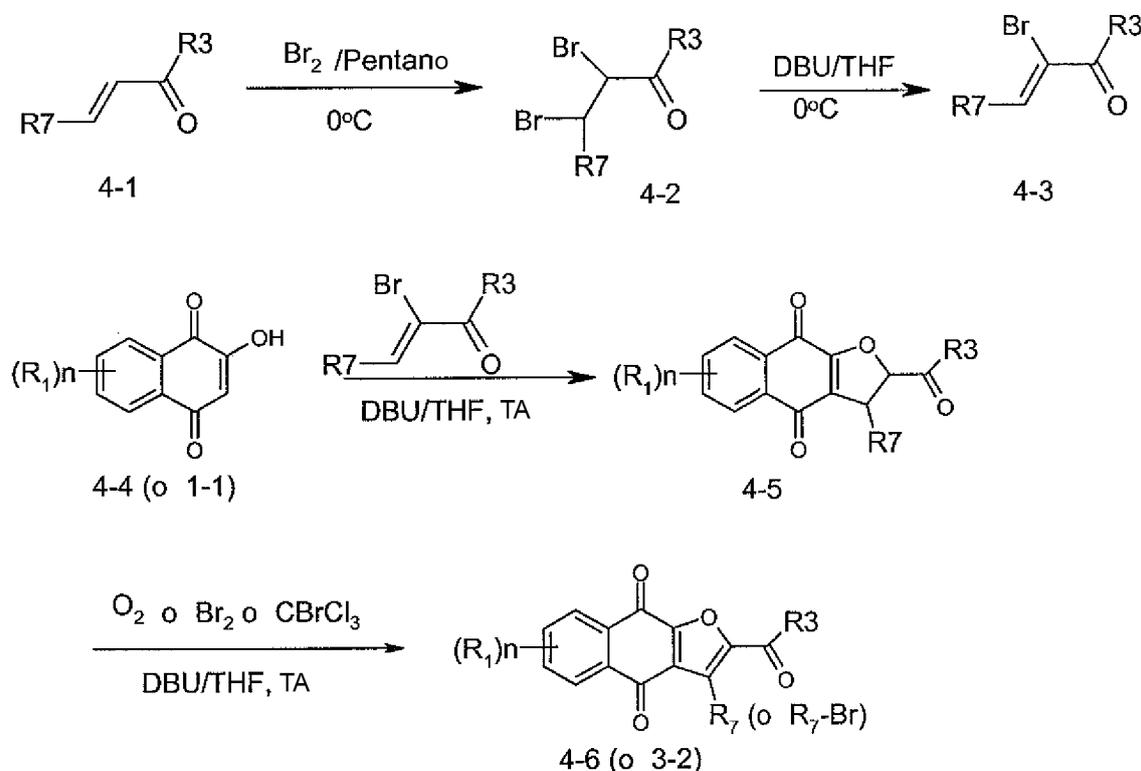
#### Ejemplo 7: Farmacocinética y perfil de toxicidad

Se realizó un análisis farmacocinético del compuesto 401 en ratas. Ratas Sprague Dawley hembra preparadas para una evaluación farmacocinética (9 ratas/grupo) se dosificaron mediante sonda nosogástrica. El volumen de la dosis fue de 10 ml/kg y cada grupo recibió unas preparaciones que contenían el artículo control (Gelucire 44/14 al 9% y vitamina E TPGS al 18% en agua estéril) o 10 o 30 mg/kg/día del compuesto 401 en el artículo control. Se recogieron muestras de sangre de 3 animales/género/momento de la predosis y aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas después de la dosis inicial. Se recolectó el plasma mediante centrifugación y se conservó en una nevera ajustada para mantenerse a  $75 \text{ }^\circ\text{C} \pm 15 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta el análisis. La porción bioanalítica de este estudio se realizó empleando un método de LC/MS/MS validado. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) fue de 10,0 ng/ml. Tal como se muestra en la figura 21, los datos farmacocinéticos demuestran que el compuesto 401 logra y mantiene una concentración crítica de hasta  $7 \text{ } \mu\text{M}$  durante hasta 8 horas.

A estas dosis no se observaron efectos tóxicos en ratas con una dosificación continua durante 28 días. Esto incluye la observación clínica, los ensayos de laboratorios, las determinaciones brutas e histológicas. Juntos, estos datos demuestran que el compuesto 401 puede lograr la exposición PK deseada para la actividad anticáncer selectiva.

## Ejemplo 8

## Esquema 1



DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

THF: tetrahidrofurano

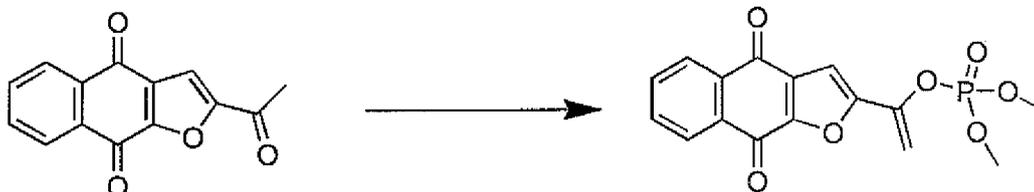
5 TA: temperatura ambiente

**Preparación de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona (compuesto de fórmula 4-6, en la que R1 = R7 = H y R3 = -CH<sub>3</sub>)**

A una disolución de 18,8 gramos (22 ml, 0,268 moles) de 3-buten-2-ona (fórmula 4-1 en el esquema 1) en 200 ml de pentano en un baño de hielo con agitación vigorosa se le añadió lentamente 39,0 gramos (12,54 ml, 0,244 moles) de bromo en 50 ml de pentano a lo largo de 30 minutos. Después de agitar durante 5 minutos más en el baño de hielo, la mezcla se evaporó para eliminar la mayor parte del pentano. Un volumen pequeño del resto de 3,4-dibromo-2 butanona (4-2) de la etapa 1 se disolvió en 400 ml de THF y después se enfrió en un baño de hielo. A la disolución en el baño de hielo con agitación vigorosa se le añadieron lentamente 37,2 gramos (36,5 ml, 0,244 moles) de DBU en 50 ml de THF a lo largo de 30 minutos. Se generó una gran cantidad de sal precipitada. La mezcla se empleó directamente para la siguiente etapa de reacción. A la mezcla de reacción de 3-bromo-3-buten-2-ona (4-3) se le añadieron 38,5 gramos (0,220 moles) de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (4-4). La mezcla resultante se agitó vigorosamente en un baño de agua a temperatura ambiente. Después se añadieron lentamente 44,6 gramos (43,8 ml, 0,293 moles) de DBU a la mezcla a lo largo de 30 minutos. La temperatura de la mezcla de reacción aumentó debido al calor generado por la reacción y se controló hasta mantenerla por debajo de 35 °C añadiendo hielo al baño de agua. Después de agitar vigorosamente durante 3 horas más al aire a temperatura ambiente se añadieron 1.800 ml de agua a la mezcla. La mezcla resultante se enfrió hasta 0 °C y después se filtró. El sólido filtrado se lavó sucesivamente con 500 ml de agua, 500 ml de bicarbonato de sodio acuoso al 5%, 500 ml de ácido acético al 1% y 250 ml de acetona enfriada en hielo. El sólido lavado se recrystalizó en 200 ml de ácido fórmico para producir 12 gramos del producto con un rendimiento global del 22,8% para el compuesto 4-6 o 3-2 (R1 = H, R3 = CH<sub>3</sub>, R7 = H). RMN de <sup>1</sup>H (en CDCl<sub>3</sub>) δ 2,67 (s, 3H), 7,61 (s, 1H-3), 7,79-7,84 (m, 2H), 8,22-8,28 (m, 2H).

**Ejemplo 9**

## Esquema 2

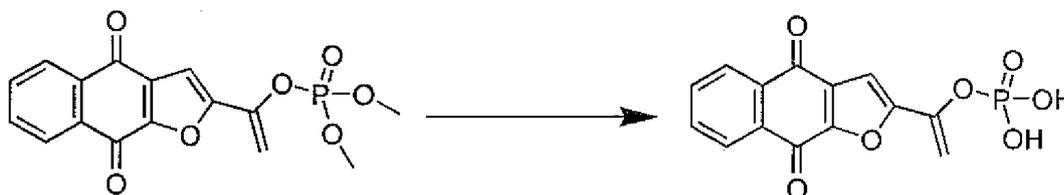
**Preparación del compuesto de mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil]éster del ácido fosfórico**

5 A una disolución de BBI6002 (240 mg, 1 mmol) en 50 THF a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  se le añadió una disolución de bis(trimetilsilil)amida de litio (1,0 M en THF, 1,2 ml). Después de agitar a esta temperatura durante 1 hora, la mezcla de reacción se agitó a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Después se añadió a esta mezcla una disolución de clorofosfato de dimetilo (217 mg, 1,5 mmol) en 5 ml de THF a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La mezcla resultante se agitó y se dejó que se calentase hasta

10 la temperatura ambiente lentamente. Después de 1 h de agitación a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó, el residuo se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se lavó con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturado y agua, y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . La evaporación del disolvente produjo la mezcla de reacción bruta, que se purificó en una cromatografía en columna para producir el 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,20-8,28 (m, 2H), 7,78-7,82 (m, 2H), 7,07 (s, 1H), 5,78 (t, 1H,  $J = 2,8\text{ Hz}$ ), 5,50 (t, 1H,  $J = 2,8\text{ Hz}$ ), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H); MS  $m/z$  347,20 (M-H).

**Ejemplo 10**

## Esquema 3

**Preparación del compuesto de 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico**

20 A una disolución de 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico (40 mg, 0,114 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 ml) a temperatura ambiente se le añadió bromuro de trimetilsililo (71 mg, 0,46 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante una HPLC semipreparativa para obtener el producto de mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil]éster del ácido fosfórico como un sólido amarillo. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,98-8,02 (m, 2H), 7,57-7,62 (m, 2H), 6,92 (s, 1H), 5,54 (t, 1H,  $J = 2,8\text{ Hz}$ ), 5,36 (t, 1H,  $J = 2,8\text{ Hz}$ ); MS  $m/z$  319,20 (M-H).

Referencias:

1. Bonnet, D., Normal and leukaemic stem cells. *Br J Haematol*, 2005.130(4): p. 469-79.
2. Bonnet, D. y J.E. Dick, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 1997. 3(7): p. 730-7.
- 5 3. Hambardzumyan, D., M. Squatrito, y E.C. Holland, Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. *Cancer Cell*, 2006. 10(6): p. 454-6.
4. Baumann, M., M. Krause, y R. Hill, Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(7): p. 545-54.
5. Ailles, L.E. e I.L. Weissman, Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol*, 2007.18(5): p. 460-6.
- 10 6. Jones, R.J., W.H. Matsui, y B.D. Smith, Cancer stem cells: are we missing the target? *J Natl Cancer Inst*, 2004. 96(8): p. 583-5.
7. Ho, M.M., et al., Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res*, 2007. 67(10): p. 4827-33,
8. Wang, J., et al., Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res*, 2007. 67(8): p. 3716-24.
- 15 9. Haraguchi, N., et al., Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells*, 2006. 24(3): p. 506-13.
10. Doyle, L.A. y D.D. Ross, Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, 2003. 22(47): p. 7340-58.
- 20 11. Alvi, A. J., et al., Functional and molecular characterization of mammary side population cells. *Breast Cancer Res*, 2003. 5(1): p. R1-8.
12. Frank, N.Y., et al., ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*, 2005. 65(10): p. 4320-33.
13. Schatton, T., et al., Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 2008. 451(7176): p. 345-9.
- 25 14. Kondo, T., T. Setoguchi, y T. Taga, Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2004. 101(3): p. 781-6.
15. Goodell, M.A., et al., Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 1996.183(4): p. 1797-806,
16. Collins, A.T., et al., Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, 2005. 65(23): p. 10946-51.
- 30 17. Li, C., et al., Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 2007. 67(3): p. 1030-7.
18. Ma, S., et al., Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*, 2007.132(7): p. 2542-56.
19. Prince, M.E., et al., Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2007.104(3): p. 973-8.
- 35 20. Ricci-Vitiani, L., et al., Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 2007. 445(7123): p. 111-5.
21. Singh, S.K., et al., Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003. 63(18): p. 5821-8.
- 40 22. Dalerba, P., et al., Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* ., 2007. 104(24): p. 10158-63.
23. Yu, H. Stat3: Linking oncogenesis with tumor immune evasion, in AACR 2008 Annual Meeting. 2008, San Diego, CA.
- 45 24. Pedrazzini, L., A. Leitch, y J. Bromberg, Stat3 is required for the development of skin cancer. *J Clin Invest*, 2004. 114(5): p. 619-22.

25. Catlett-Falcone, R., et al., Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 1999. 10(1): p. 105-15.
26. Bromberg, J.F., et al., Stat3 as an oncogene. *Cell*, 1999. 98(3): p. 295-303.
- 5 27. Kanda, N., et al., STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene*, 2004. 23(28): p. 4921-9.
28. Schlette, E .J., et al., Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 2004. 22(9): p. 1682-8.
29. Niu, G., et al., Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 2002. 21(13): p. 2000-8.
- 10 30. Xie, T.X., et al., Stat 3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase- 2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene*, 2004. 23(20): p. 3550-60.
31. Kortylewski, M., et al., Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*, 2005, 11(12): p. 1314-21.
- 15 32. Burdelya, L., et al., St at 3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects. *J Immunol*, 2005. 174(7): p. 3925-31.
33. Wang, T., et al., Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*, 2004.10(1): p. 48-54.
34. Darnell, J.E., Validating Stat3 in cancer therapy. *Nat Med*, 2005.11(6): p. 595-6.
- 20 35. Zhang, L., et al., Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium carrying plasmid-based small interfering RNAs. *Cancer Res*, 2007. 67(12): p. 5859-64.
36. Campbell, I.L., Cytokine-mediated inflammation, tumorigenesis, and disease- associated JAK/STAT/SOCS signaling circuits in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005. 48(2): p. 166-77.
- 25 37. Harris, T.J., et al., Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TNF $\alpha$  development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol*, 2007.179(7): p. 4313-7.
38. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Masci, Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002.105(9): p. 1135-43.
39. Stephens, J.W., et al., A common functional variant in the interleukin-6 gene is associated with increased body mass index in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Mol Genet Metab*, 2004. 82(2): p. 180-6.
- 30 40. Cesari, M., et al., Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation*, 2003.108(19): p. 2317-22.
41. Orshal, J.M. y R.A. Khalil, Interleukin-6 impairs endothelium-dependent NO- cGMP-mediated relaxation and enhances contraction in systemic vessels of pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. 286(6): p. R1013-23.
- 35 42. Manolagas, S.C., Role of cytokines in bone resorption. *Bone*, 1995. 17(2 Suppl.): p. 63S-67S.
43. Yaffe, K., et al., Inflammatory markers and cognition in well-functioning African- American and white elders. *Neurology*, 2003. 61(1): p. 76-80.
44. Watson, C J. y W.R. Miller, Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer*, 1995. 71(4): p. 840-4.
- 40 45. Song, J J. y J.R. Grandis, STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene*, 2000. 19(21): p. 2489-95.
46. Song, L., et al., Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene*, 2003. 22(27): p. 4150-65.
47. Savarese, T.M., et al., Coexpression of oncostatin M and its receptors and evidence for STAT3 activation in human ovarian carcinomas. *Cytokine*, 2002. 17(6): p. 324-34.
- 45 48. Toyonaga, T., et al., Blockade of constitutively activated Janus kinase/signal transducer and activator of transcription-3 pathway inhibits growth of human pancreatic cancer. *Cancer Lett*, 2003. 201(1): p. 107-16.

49. Corvinus, F.M., et al., Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia*, 2005. 7(6): p. 545-55,
50. Gao, B., et al., Constitutive activation of JAK-STAT3 signaling by BRCA1 in human prostate cancer cells. *FEBS Lett*, 2001. 488(3): p. 179-84.
- 5 51. Buettner, R., L.B. Mora, y R. Jove, Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(4): p. 945-54.
52. Carson, W.E., Interferon-alpha-induced activation of signal transducer and activator of transcription proteins in malignant melanoma. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(9): p. 2219-28.
- 10 53. Chen, C.L., et al., Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers. *Br J Cancer*, 2007. 96(4): p. 591-9.
54. Lai, R., et al., STAT3 is activated in a subset of the Ewing sarcoma family of tumours *J Pathol*, 2006. 208(5): p. 624-32.
55. Punjabi, A.S., et al., Persistent activation of STAT3 by latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of endothelial cells. *J Virol*, 2007. 81(5): p. 2449-58.
- 15 56. Schaefer, L.K., et al., Constitutive activation of Stat3alpha in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2). *Oncogene*, 2002. 21(13): p. 2058-65.
57. Puthier, D., R. Bataille, y M. Amiot, *IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK/STAT rather than ras /MAP kinase pathway*. *Eur J Immunol*, 1999. 29(12): p. 3945-50.
- 20 58. Migone, T.S., et al., Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science*, 1995. 269(5220): p. 79-81.
59. Spiekermann, K., et al., Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia. *Eur J Haematol*, 2001. 67(2): p. 63-71.
60. Epling-Bumette, P.K., et al., Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest*, 2001.107(3): p. 351-62.
- 25 61. Weber-Nordt, R.M., et al., Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*, 1996. 88(3): p. 809-16.
62. Sommer, V.H., et al., In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an antiapoptotic function of STAT3. *Leukemia*, 2004.18(7): p. 1288-95.
- 30 63. Lai, R., et al., Signal transducer and activator of transcription-3 activation contributes to high tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Am J Pathol*, 2004.164(6): p. 2251-8.
64. Fu, X.Y., STAT3 in immune responses and inflammatory bowel diseases. *Cell Res*, 2006.16(2): p. 214-9.
65. Feldmann, M., F.M. Brennan, y R.N. Maini, Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *AnnuRev Immunol*, 1996.14: p. 397-440.
- 35 66. Krause, A., et al., Rheumatoid arthritis synoviocyte survival is dependent on Stat3. *J Immunol*, 2002.169(11): p. 6610-6.
67. Pfitzner, E., et al., The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des*, 2004.10(23): p. 2839-50.
- 40 68. Lovato, P., et al., Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem*, 2003. 278(19): p. 16777-81.
69. Ishihara, K. y T. Hirano, IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002.13(4-5): p. 357-68.
70. Ivashkiv, L.B. e I. Tassioulas, Can SOCS make arthritis better? *J Clin Invest*, 2003. 111(6): p. 795-7.
- 45 71. Sengupta, T.K., et al., Activation of monocyte effector genes and STAT family transcription factors by inflammatory synovial fluid is independent of interferon gamma. *J Exp Med*, 1995.181(3): p. 1015-25.
72. Shouda, T., et al., Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for

- treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest*, 2001. 108(12): p. 1781-8.
73. Harada, T., et al., Increased expression of STAT3 in SLE T cells contributes to enhanced chemokine-mediated cell migration. *Autoimmunity*, 2007. 40(1): p. 1-8.
- 5 74. Simeone-Penney, M.C., et al., Airway epithelial STAT3 is required for allergic inflammation in a murine model of asthma. *J Immunol*, 2007.178(10): p. 6191-9.
75. Hagler, M., Smith-Norowitz, T., Chice, S., Wallner, S., Viterbo, D., Mueller, C., Groos, R., Nowakowski, M., Schulze, R., Zenilman, M., Sphorolipids decrease IgE production in U266 cells by downregulation of BSAP (Pax5), TLR-2, STAT3 and IL-6. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007.119(S 1): p. S263-S263.
- 10 76. Benkhart, E.M., et al., Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol*, 2000. 165(3): p. 1612-7.
77. Sano, S., et al., Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med*, 2005.11(1): p. 43-9.
78. Lim, C.P., et al., Stat3 contributes to keloid pathogenesis via promoting collagen production, cell proliferation and migration. *Oncogene*, 2006. 25(39): p. 5416-25.
- 15 79. Arany, I., et al., Correlation between pretreatment levels of interferon response genes and clinical responses to an immune response modifier (Imiquimod) in genital warts. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. 44(7): p. 1869-73.
80. Tefferi, A., Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2006: p. 240-5.
- 20 81. Roder, S., et al., STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp Hematol*, 2001. 29(6): p. 694-702.
82. Kim, O.S., et al., JAK-STAT signaling mediates gangliosides-induced inflammatory responses in brain microglial cells. *J Biol Chem*, 2002. 277(43): p. 40594-601.
- 25 83. Wyss-Coray, T., Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med*, 2006. 12(9): p. 1005-15.
84. Stelmasiak, Z., et al., Interleukin-6 concentration in serum and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients. *Med Sci Monit*, 2000, 6(6): p. 1104-8.
85. Ponti, D., et al., Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 2005. 65(13): p. 5506-11.
- 30 86. Szotek, P.P., et al., Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006.103(30): p. 11154-9.
87. Al-Hajj, M., et al., Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 2004. 14(1): p. 43-7.
88. Bleau, A.M., et al., New strategy for the analysis of phenotypic marker antigens in brain tumor-derived neurospheres in mice and humans. *Neurosurg Focus*, 2008. 24(3- 4): p. E28.

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición que comprende (i) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil]éster del ácido fosfórico, y 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una de sus sales farmacéuticamente aceptables o solvatos, y (ii) un excipiente, vehículo o diluyente para su uso para inhibir una célula madre del cáncer para tratar un cáncer en el que se ha descubierto la presencia de células madre del cáncer y la presencia de una actividad aberrante de la ruta de Stat3, en un sujeto que lo necesite, en la que el excipiente, vehículo o diluyente comprende:
- 10 un lípido seleccionado del grupo que consiste en un fosfolípido, fosfatidilcolina sintética, fosfatidilcolina natural, esfingomielina, ceramida, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, colesterol, sulfato de colesterol, y lípidos conjugados con haptenos y polietilenglicol (PEG) para la administración intravenosa; o
- un material ceroso seleccionado del grupo que consiste en mono-, di- o triglicéridos, mono- o diésteres de ácidos grasos de PEG, vitamina E conjugada con PEG, y Gelucire para la administración oral; o
- 15 el excipiente, vehículo o diluyente está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una emulsión micelar, una suspensión, y una suspensión de nanopartículas, y comprende además albúmina humana para la administración intravenosa.
- 2.- La composición para el uso según la reivindicación 1, en la que la composición inhibe la autorrenovación de las células madre del cáncer.
- 20 3.- La composición para el uso según la reivindicación 1, en la que la composición mata a las células madre del cáncer.
- 4.- La composición para el uso según la reivindicación 1, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, melanoma, sarcoma, cáncer hepático, tumores cerebrales, mieloma múltiple y leucemia.
- 25 5.- La composición para el uso según la reivindicación 1, en la que el cáncer es metastásico, es refractario a la quimioterapia o la radioterapia, o ha recurrido después de un tratamiento inicial.
- 6.- La composición para el uso según la reivindicación 1, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer renal, sarcoma, mieloma múltiple, cáncer de mama metastásico, leucemia, linfoma, cáncer esofágico, tumor cerebral, glioma, cáncer de vejiga, cáncer endometrial, cáncer de tiroides, cáncer de los conductos biliares, cáncer de hueso, cáncer de ojo (retinoblastoma), cáncer de la vesícula biliar, cáncer de la pituitaria, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de las glándulas salivares, cáncer nasofaríngeo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, neuroblastoma, cáncer de cérvix, melanoma, y cáncer de piel.
- 30 7.- La composición para el uso según la reivindicación 6, en la que el cáncer es cáncer colorrectal.
- 8.- La composición para el uso según la reivindicación 6, en la que el cáncer es cáncer gástrico.
- 9.- La composición para el uso según la reivindicación 6, en la que el cáncer es cáncer esofágico.
- 10.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición se administra por ruta oral y no más de cuatro veces diarias (QID).
- 40 11.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición se emplea a una dosificación de aproximadamente 1 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 50.000 mg/m<sup>2</sup> (PO).
- 12.- La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición se emplea a una dosificación de aproximadamente 10 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 50.000 mg/m<sup>2</sup> (PO).
- 45 13.- La composición para uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto es 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona.

Figura 1

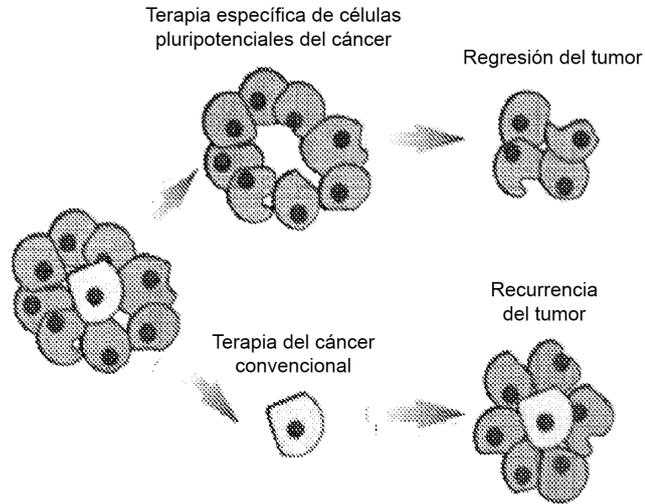


Figura 2

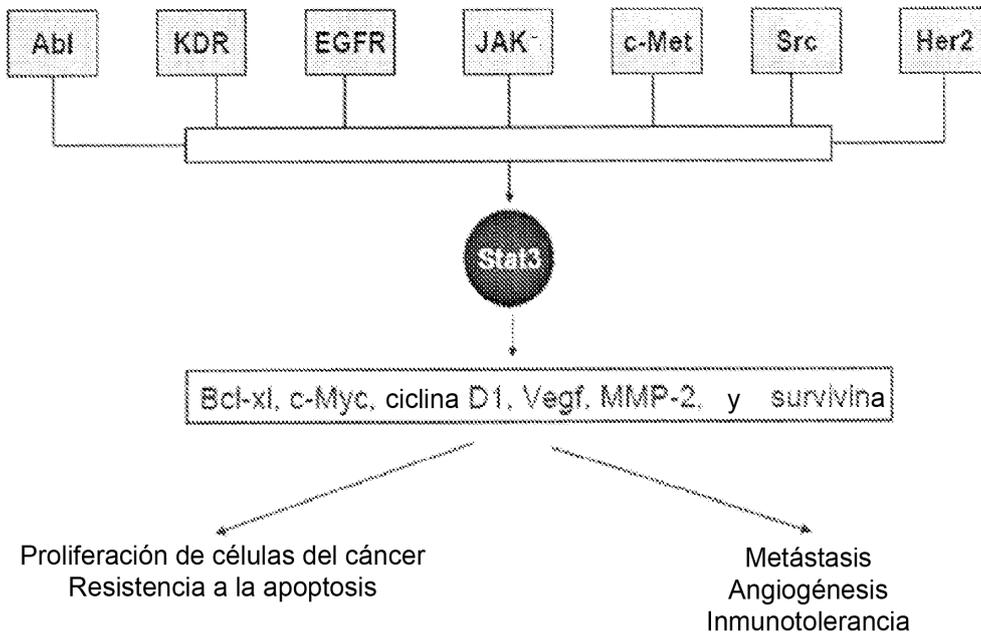


Figura 3A

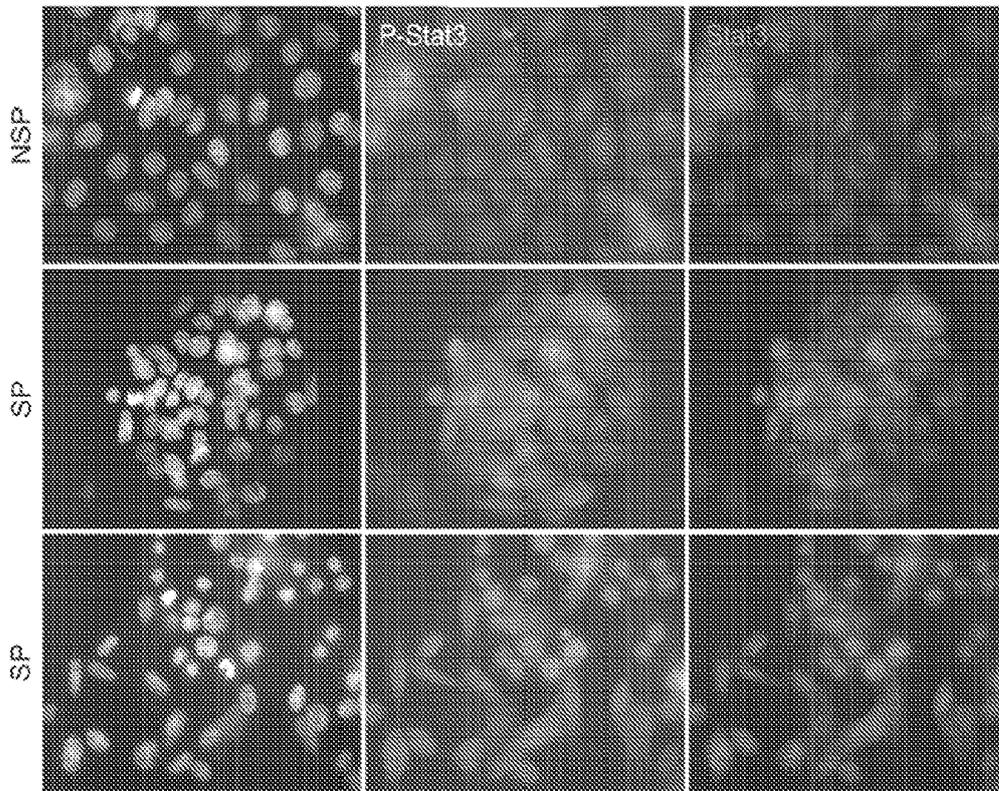


Figura 3B

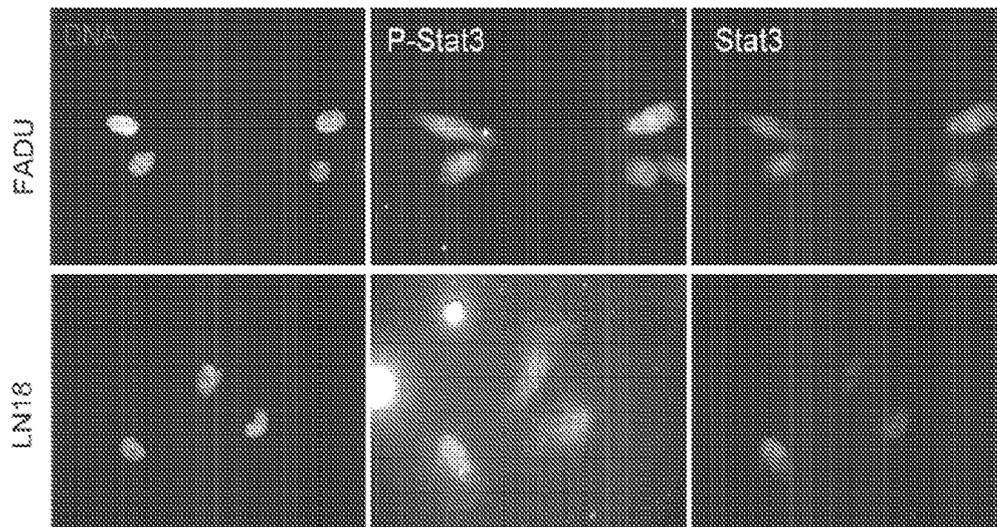


Figura 4A

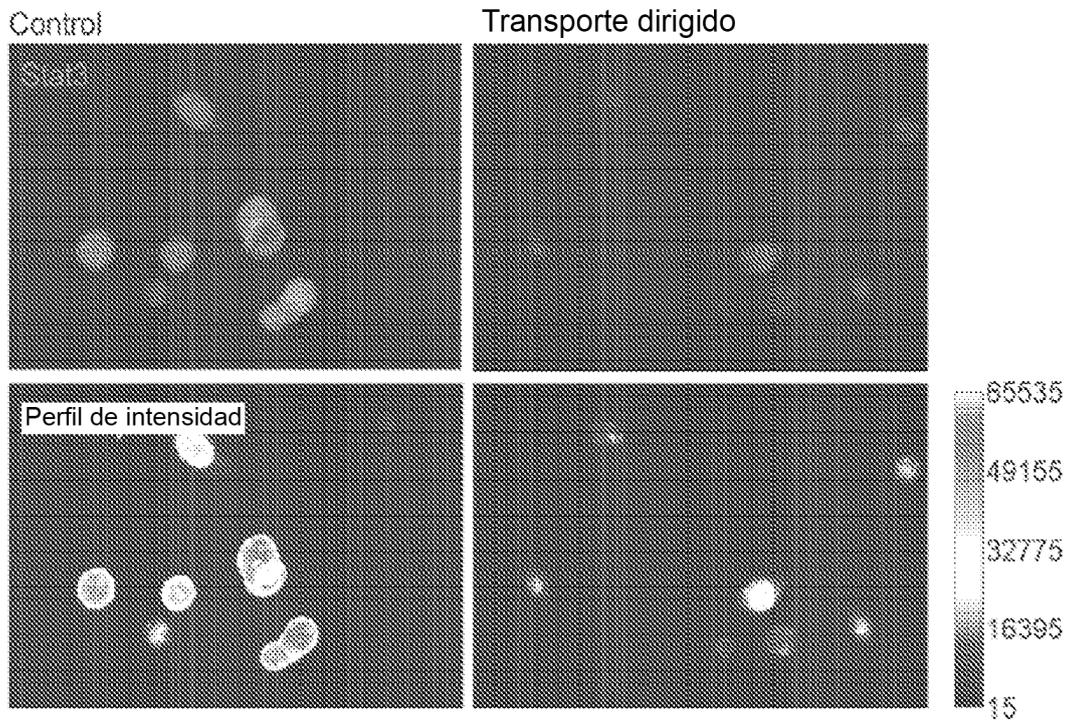


Figura 4B

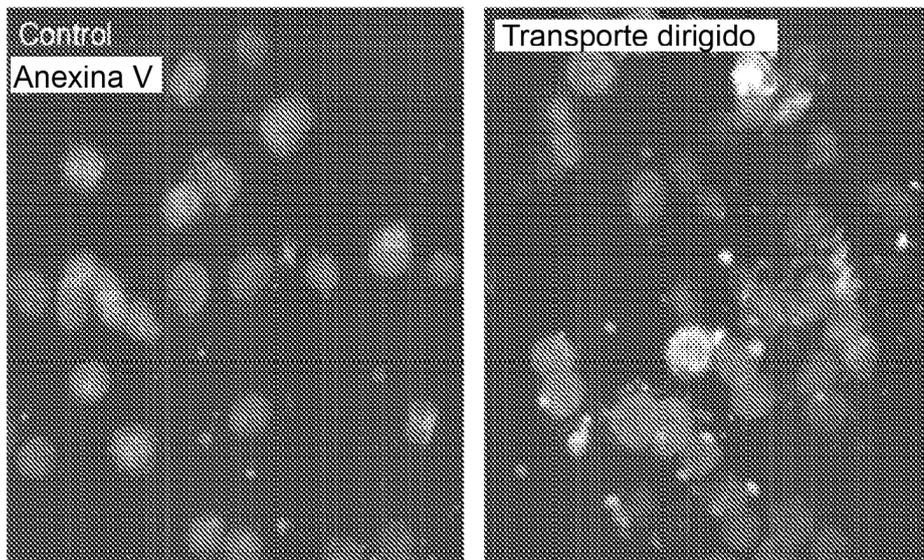


Figura 5

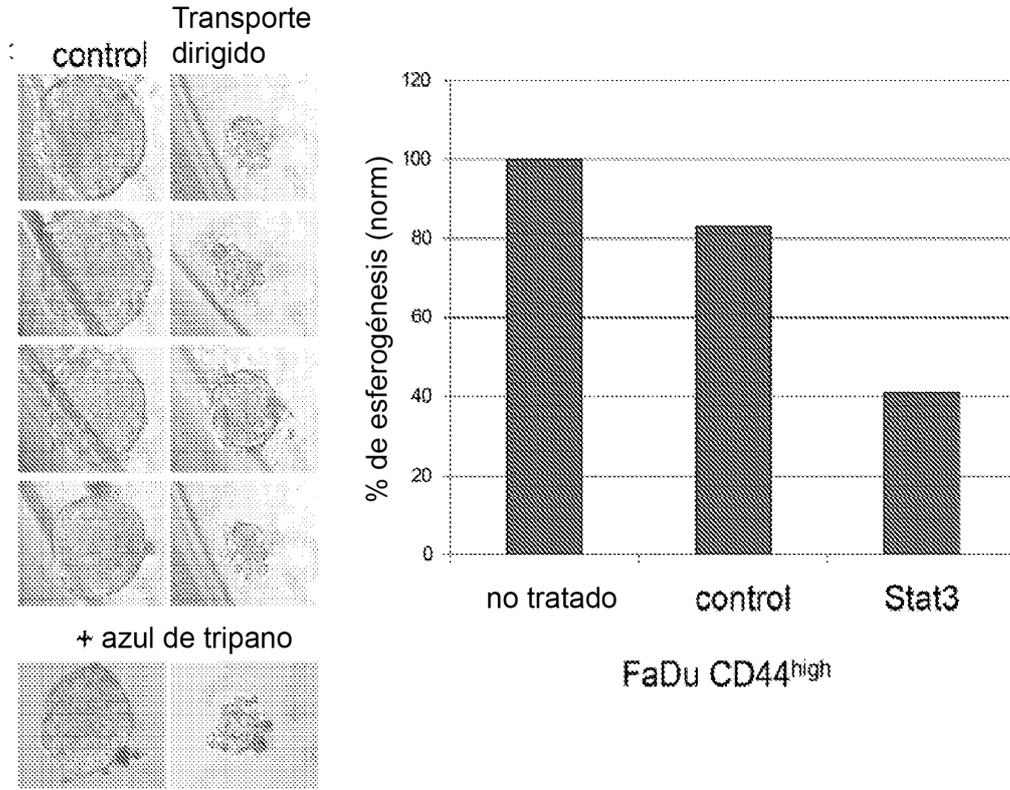


Figura 6

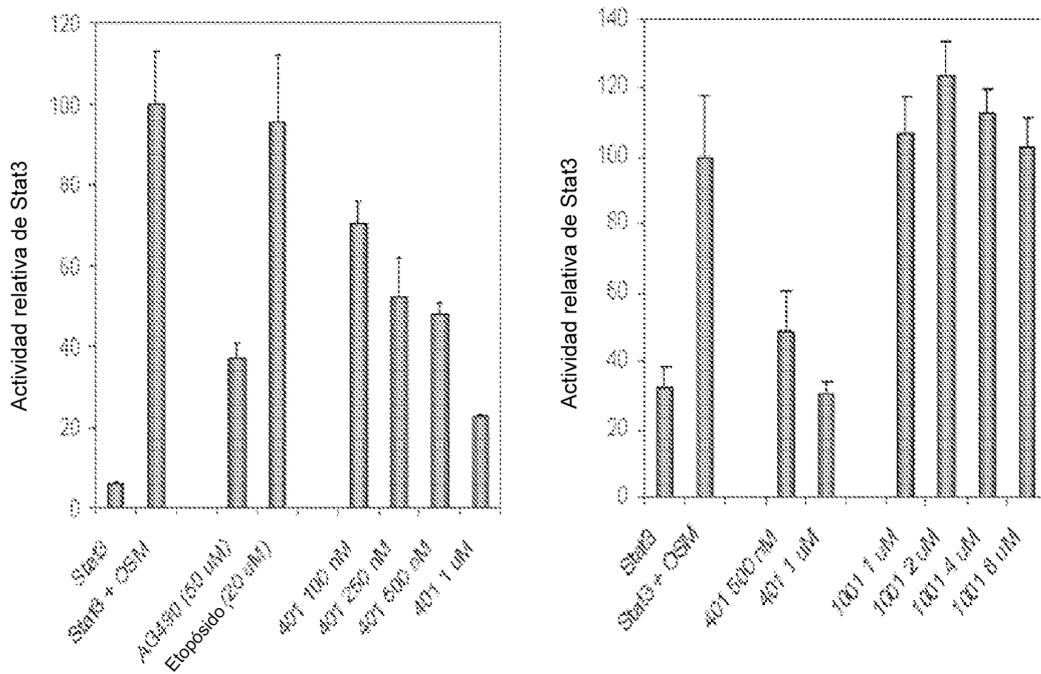


Figura 7A

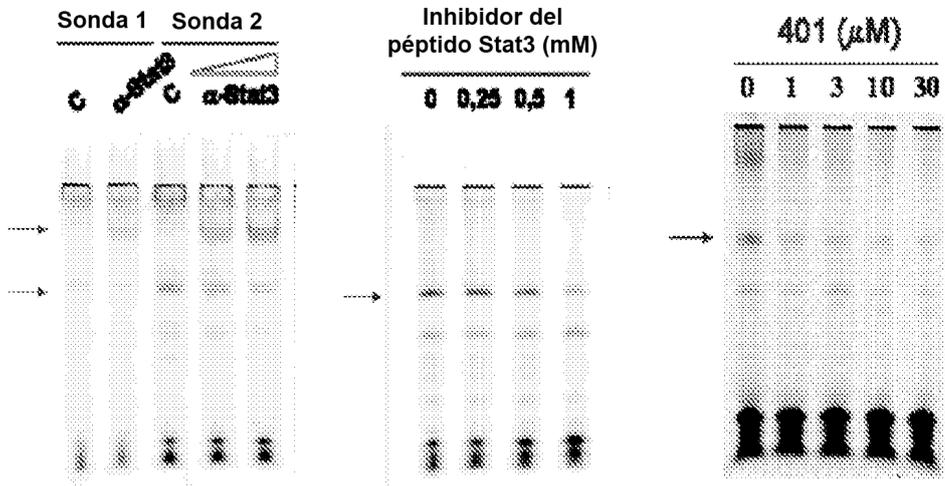


Figura 7B

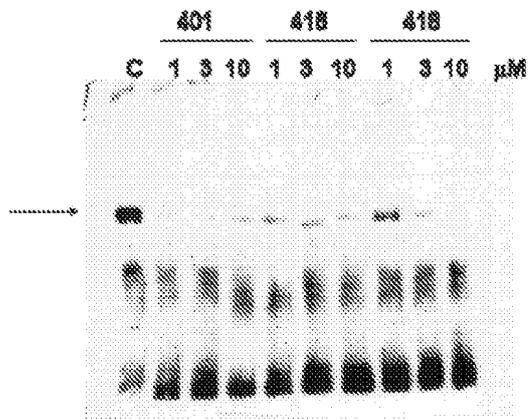


Figura 8

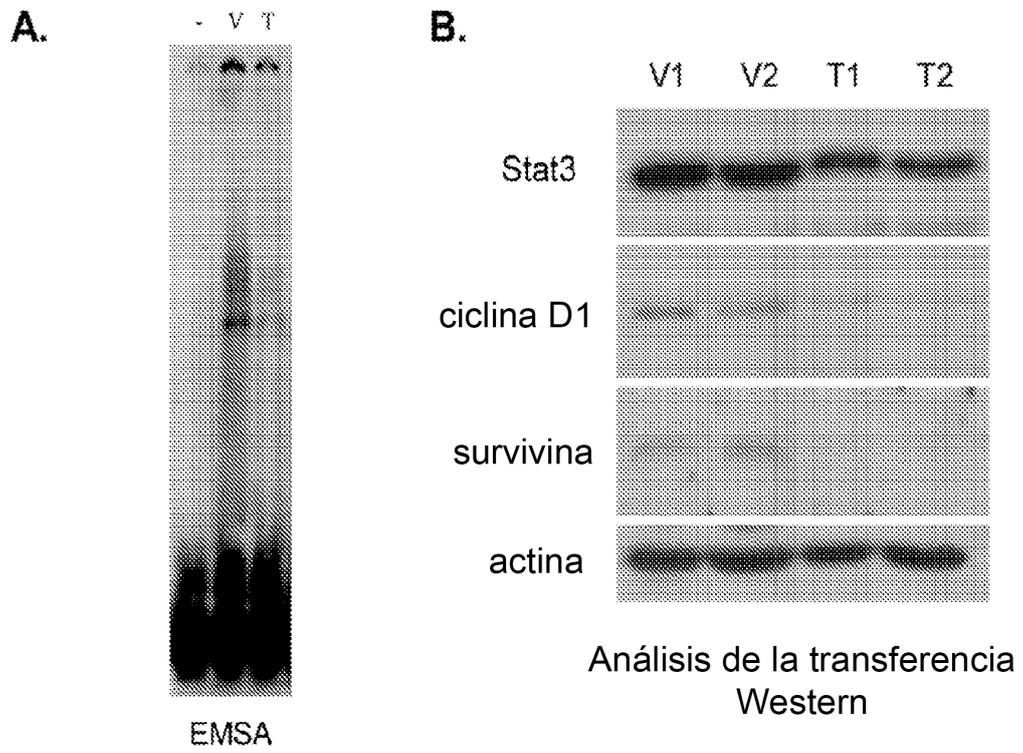
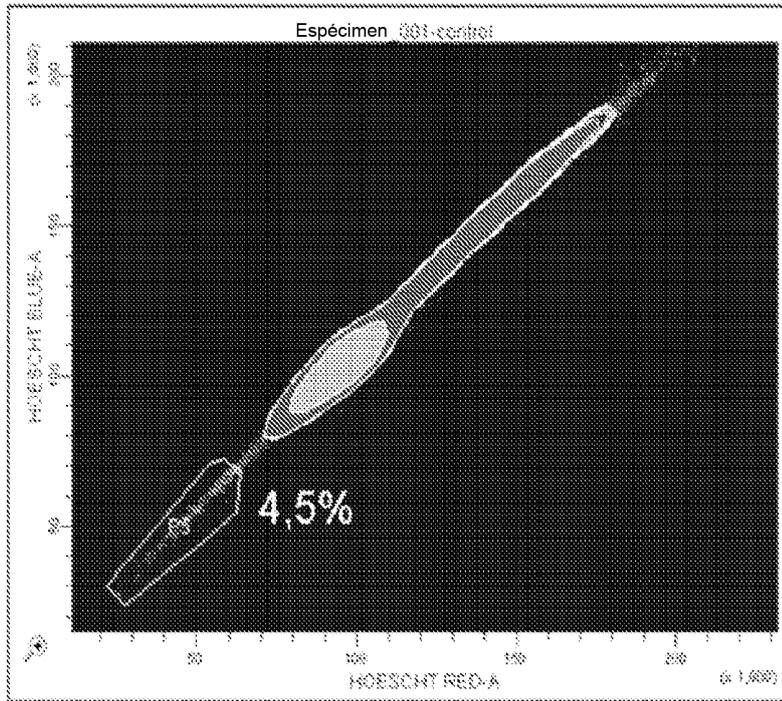
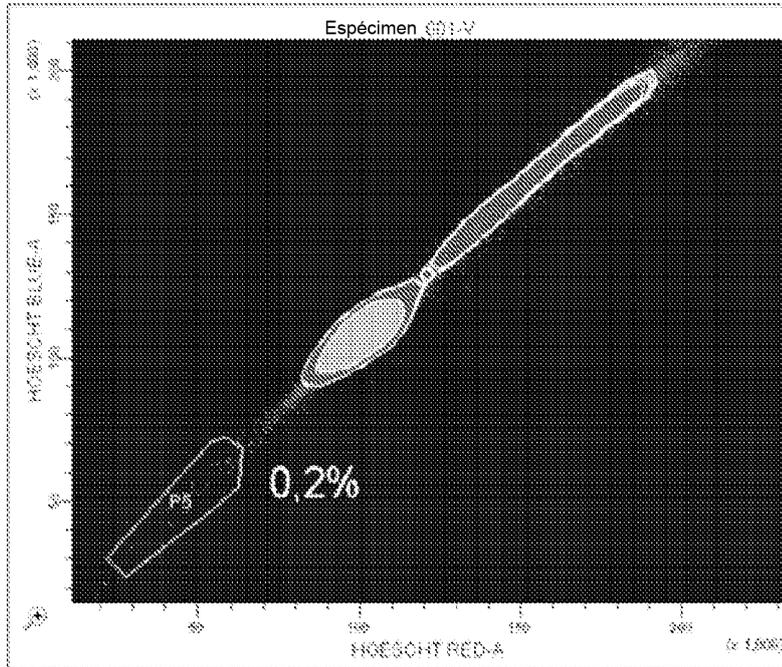


Figura 9A



(-) Verapamilo



(+) Verapamilo

Figura 9B

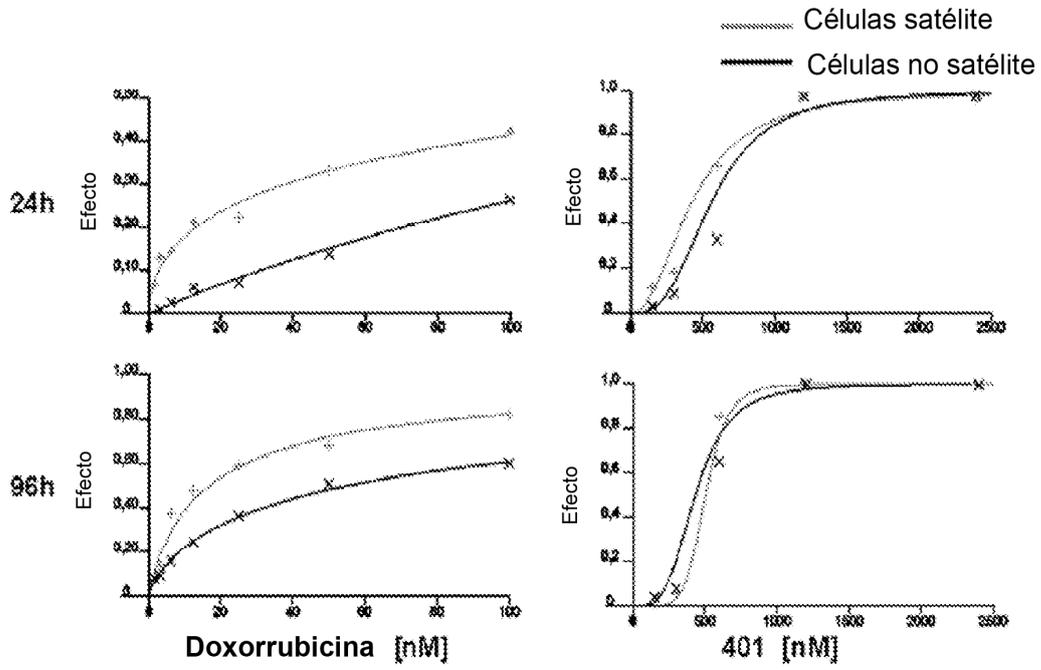


Figura 10A

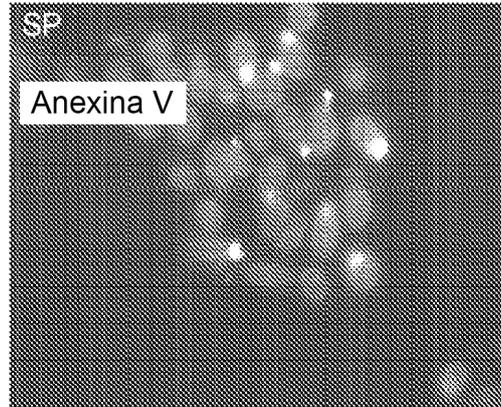


Figura 10B

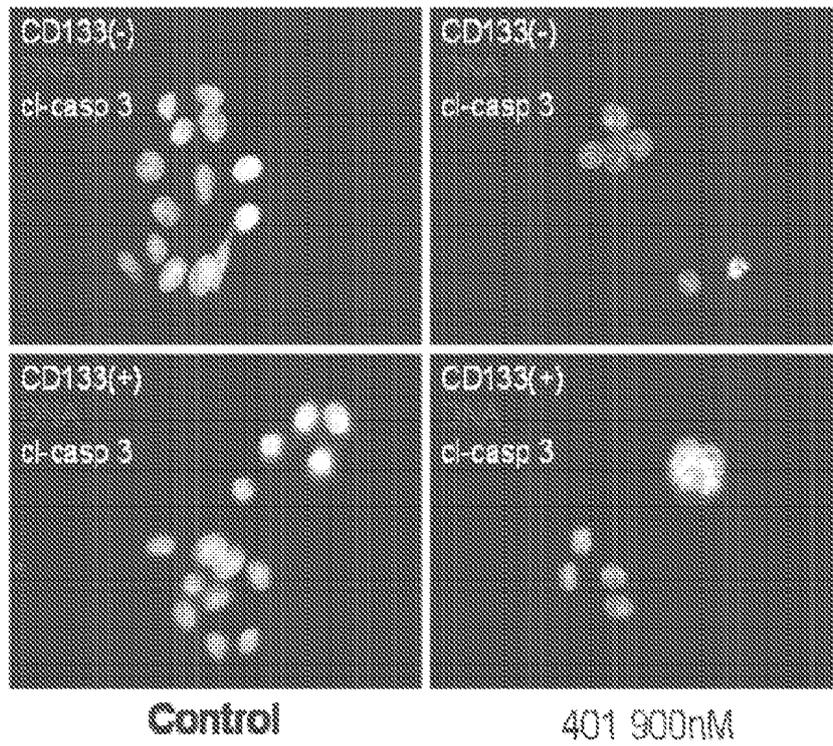


Figura 11

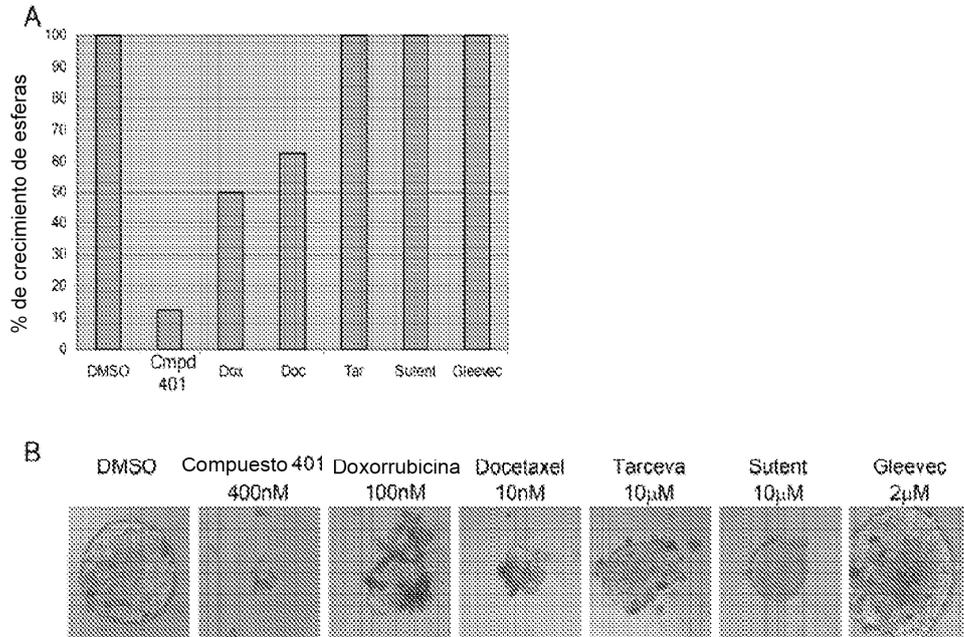
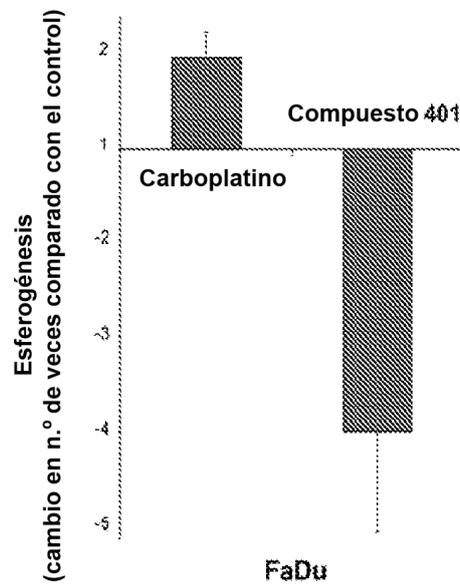
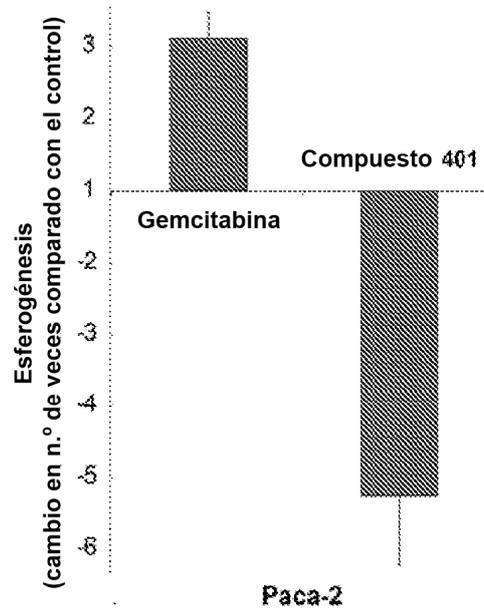


Figura 12



**Figura 13**  
**Células DU145 - Tratamiento de 5 horas**

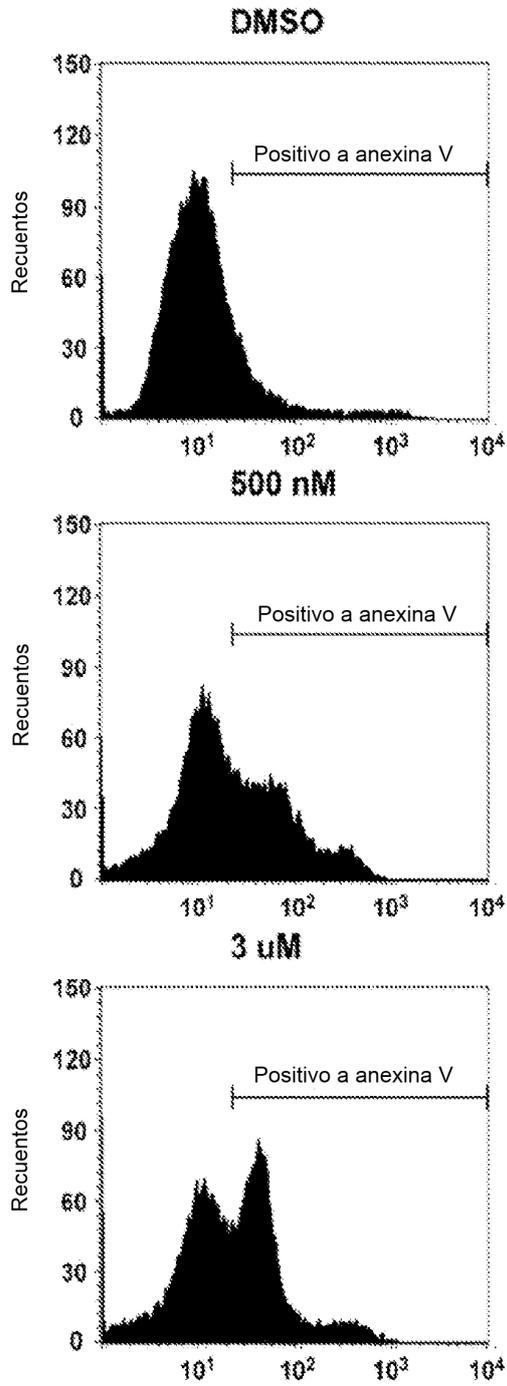


Figura 14

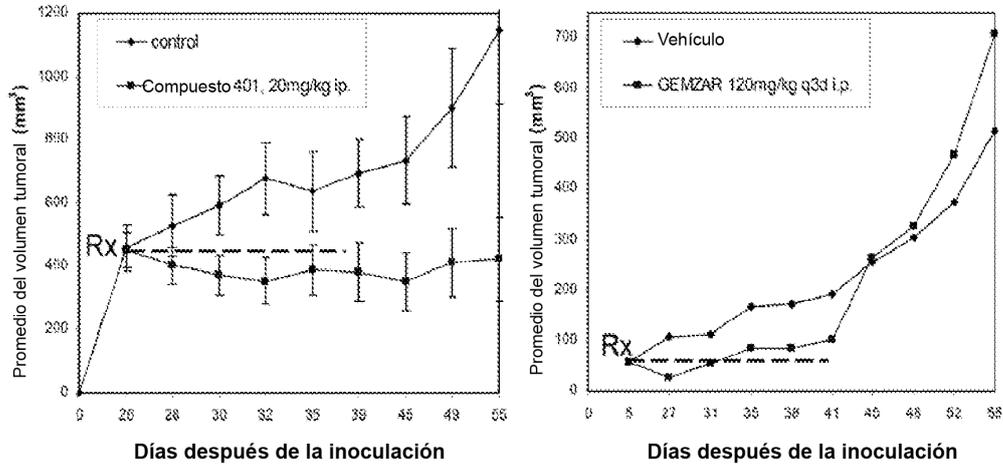


Figura 15

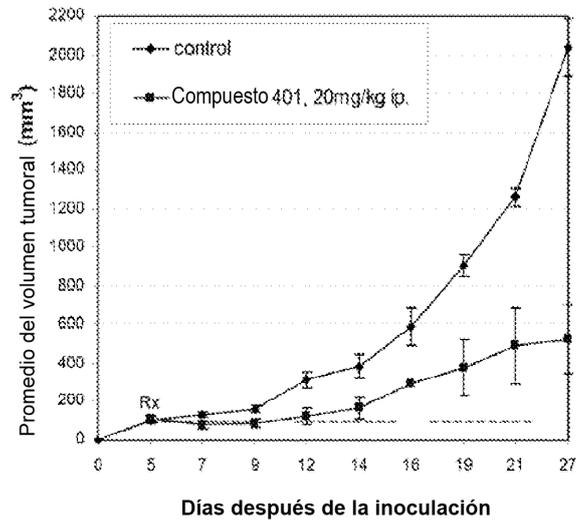
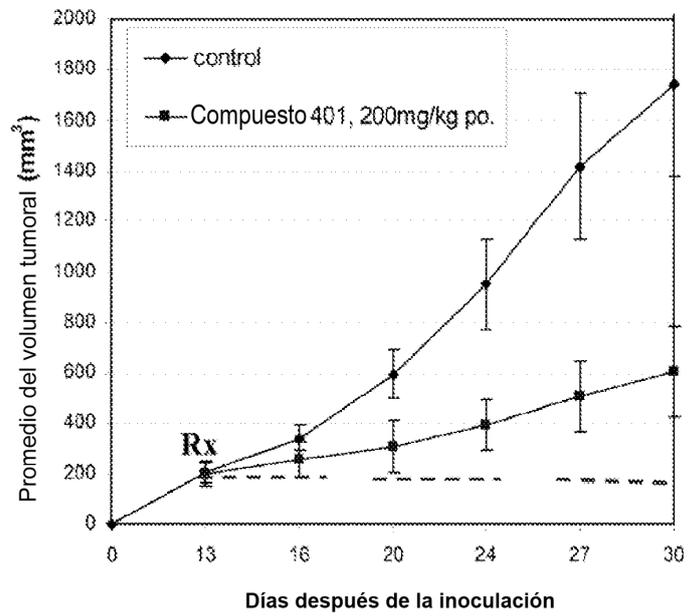
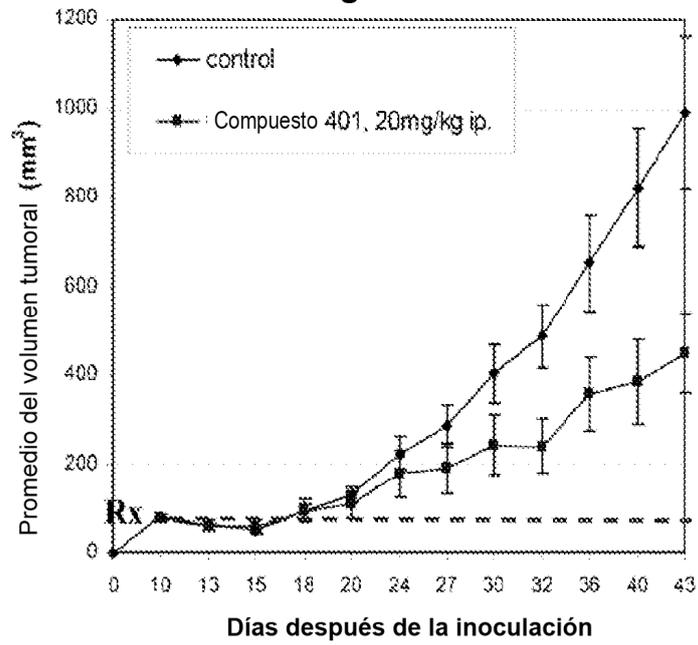


Figura 16



**Figura 17**



**Figura 18**

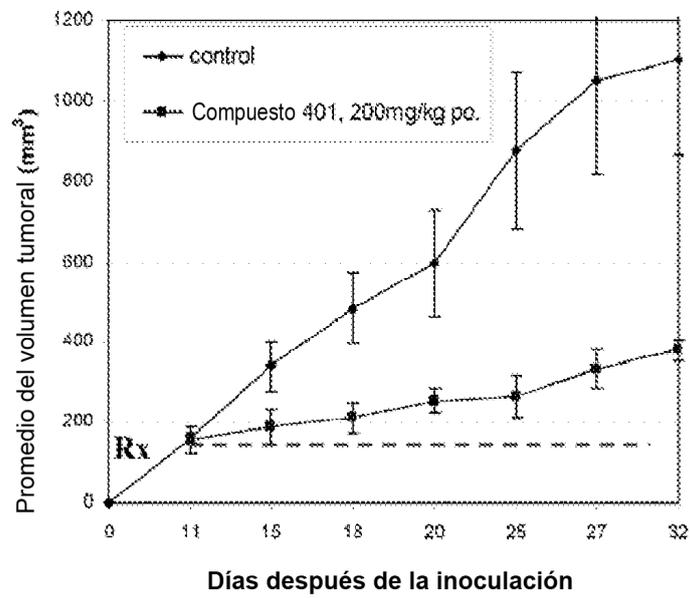


Figura 19

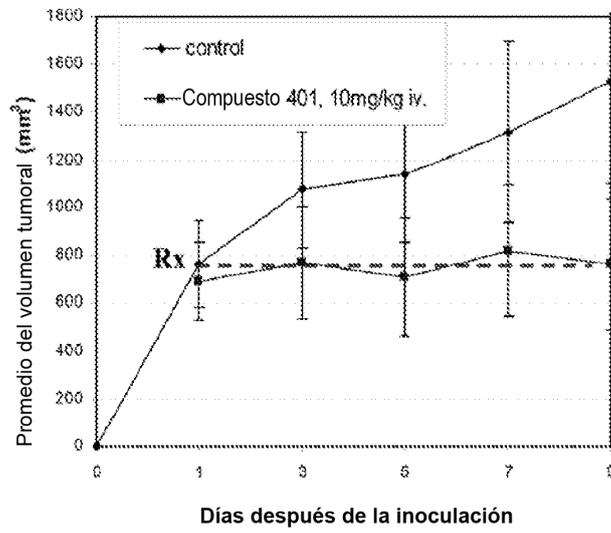
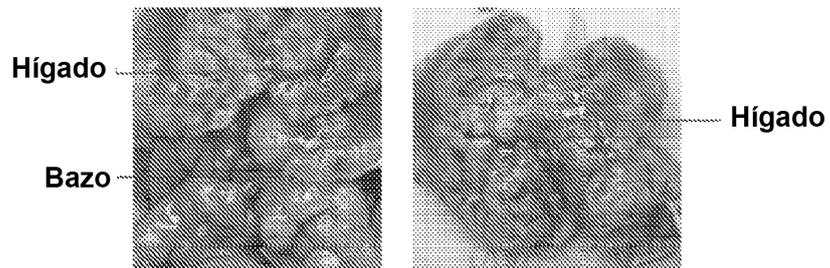


Figura 20

Control en el día 30



Fotografías representativas *in situ*:

401 en el día 30

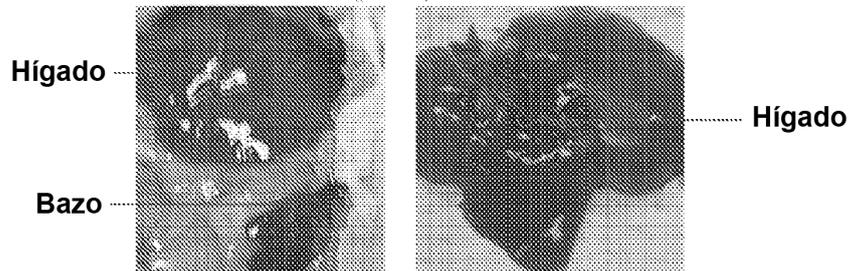


Figura 21

