

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 904**

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 08830633 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2200431**

54 Título: **Nuevas composiciones y métodos para el tratamiento 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:  
**30.09.2016**

73 Titular/es:

**BOSTON BIOMEDICAL, INC. (100.0%)**  
**640 Memorial Drive**  
**Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**LI, CHIANG, JIA;**  
**MIKULE, KEITH y**  
**LI, YOUZHI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 584 904 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

Nuevas composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones para el uso de inhibidores de la ruta de Stat3 e inhibidores de células madre del cáncer en un tratamiento combinatorio de cánceres y otros trastornos.

**Antecedentes de la invención****Células madre del cáncer (CSC, del inglés "cancer stem cells")**

10 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  
15 demostraron que solo una pequeña subpoblación de células de AML humana tenían 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 cerebrales, mama, piel, próstata, etc.

20 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.  
25 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 cultivos 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.

30 Las células madre del cáncer comparten muchos rasgos similares con las células madre normales. Por ejemplo, las CSC tienen capacidad de auto-renovación, 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 también que su heterogeneidad normalmente se mantiene en las  
35 metástasis tumorales. Las CSC han demostrado ser fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la reaparición del cáncer. Las CSC también se denominan células iniciadores del tumor, 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.

40 La existencia de células madre del cáncer tiene implicaciones fundamentales en los futuros tratamientos y terapias contra el cáncer. 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 constituirán una proporción muy pequeña del tumor y tienen unas características biológicas muy diferentes de sus progenies más diferenciadas, la medición de la masa tumoral puede no seleccionar  
45 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 mecanismos de reparación del ADN eficientes. Además, también pueden tener una velocidad lenta de recambio celular, mientras que los agentes quimioterapéuticos se dirigen a células de replicación rápida.  
50 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 que es incapaz de regenerar tumores. Por otra parte, la población de células madre del cáncer que genera las células diferenciadas y en diferenciación, podría permanecer  
55 intacta y provocar una recidiva de la enfermedad. Otro peligro con respecto a la terapia anti-cáncer convencional es la posibilidad de que el tratamiento, por ejemplo, de quimioterapia 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 la necesidad de eliminar las raíces de diente de león para evitar que la maleza vuelva a crecer [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 por lo tanto mantener la esperanza de supervivencia y la calidad de vida mejorada de los pacientes con cáncer, en especial para aquellos con 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 auto-renovación de las células madre del cáncer. Aunque en el pasado se han elucidado múltiples rutas que subyacen a la tumorigénesis en el cáncer y en células madre embrionarias y células madre de de adulto, no se han identificado y validado rutas para la auto-renovación 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 la población lateral (“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, la SP se revela bloqueando el eflujo del fármaco con verapamilo, momento en el que los tintes ya no pueden ser expulsados de las SP.

Los investigadores también se han centrado en descubrir marcadores específicos que distingan a las células madre del cáncer de la masa del tumor. Los marcadores de la superficie de CSC que son expresados más comúnmente incluyen CD44, CD133 y CD166 [16-24]. La clasificación de las células tumorales basada principalmente en la expresión diferencial de esto(s) marcador(es) 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 de tirosina crítico mediada por tirosina quinasas del receptor del factor del crecimiento, quinasas Janus, 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 [25]. 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 [26] (véase la Figura 2).

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 la progresión 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 [27-32]. También es un regulador negativo clave de la vigilancia inmune del tumor y del reclutamiento de células inmunes [33-35].

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* [26, 28, 36, 37]. 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, se ha demostrado recientemente que las células madre del cáncer (CSC) son fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la reparación del cáncer, y deben tomarse en cuenta cuando se diseñe cualquier terapia curativa que se dirija a un tumor que se sabe que tiene estas células, sin tener en cuenta la pequeña fracción que pueden constituir dentro de la masa tumoral.

En otras enfermedades distintas del cáncer, se ha demostrado la sobreactivación de Stat3 por varias citoquinas, tales como la interleuquina 6 (IL6) en una serie de enfermedades autoinmunes e inflamatorias [38]. Recientemente, se ha revelado que la ruta de Stat3 también estimula respuestas inmunes patológicas a través de su papel fundamental en la generación de respuestas de células T TH17 [39]. 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 arterial coronaria, la hipertensión, la osteoporosis, la diabetes de tipo 2 y la demencia.

## Resumen

La presente invención se basa, en parte, en las pruebas empíricas proporcionadas en la presente de que Stat3 desempeña un papel clave tanto en la capacidad de supervivencia como de auto-renovación de las células madre del cáncer (CSC) a lo largo de un amplio espectro de cánceres. La presente descripción también proporciona datos que confirman que determinados compuestos actúan como inhibidores de la ruta de Stat3 y que inhiben eficazmente las CSC tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por consiguiente, un primer aspecto de esta descripción proporciona un método para tratar a un sujeto con un trastorno que está asociado con actividad aberrante de la ruta de Stat3, comprendiendo el método las etapas de: (a) administrar al sujeto una primera cantidad de un primer agente para inhibir al menos parte de la actividad aberrante de la ruta de Stat3; y (b) administrar al sujeto una segunda cantidad de un segundo agente que comprende un inhibidor de la transducción de la señal.

El primer agente puede inhibir la actividad de la ruta de Stat3 a través de al menos una de las acciones siguientes: 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 a ADN de la proteína Stat3, e inhibir sustancialmente las actividades de transcripción de la proteína Stat3.

El primer agente se selecciona 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-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, un enantiómero, diastereómero, tautómero, y una sal o solvato de éstos (denominado en los sucesivos en la presente el "Compuesto de la Invención").

Los trastornos no cancerosos que pueden tratarse por los métodos del primer aspecto de esta descripción incluyen pero no están limitados a: enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades intestinales inflamatorias, artritis, asma, y lupus eritematoso sistémico, trastorno de desmielinación autoinmune, enfermedad de Alzheimer, ictus, lesión por reperfusión tras isquemia, y esclerosis múltiple. Los cánceres que pueden tratarse por los métodos de esta invención incluyen pero no están limitados 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. Se sabe que estos trastornos no cancerosos y cancerosos están asociados con actividades aberrantes de la ruta de Stat3.

En una característica, el segundo agente es un agente dirigido, que puede ser un agente dirigido a un receptor de factor de crecimiento, un agente dirigido a quinasa, o un inhibidor de la angiogénesis.

La presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto de un cáncer que está asociado con actividad aberrante de la ruta de Stat3, comprendiendo el método las etapas de: (a) administrar al sujeto una primera cantidad de un primer agente para inhibir al menos parte de la actividad aberrante de la ruta de Stat3; y (b) administrar al sujeto una segunda cantidad de un segundo agente anti-cáncer.

En particular, la presente invención proporciona una combinación que comprende un primer agente para inhibir la actividad aberrante de la ruta de Stat3 y un segundo agente para uso en el tratamiento de un sujeto con un cáncer que está asociado con actividad aberrante de la ruta de Stat3, en el que el primer agente se selecciona 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-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste; y el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel, erlotinib, sunitinib, lapatinib, sorafenib, carboplatino, doxorubicina, docetaxel, gemcitabina, y etopósido.

Aunque las características respecto al primer agente pueden ser similares a las descritas respecto al primer aspecto de esta descripción, el segundo agente anti-cáncer puede ser un agente citotóxico, o un agente quimioterapéutico. En una realización, el segundo agente es un tratamiento de primera línea estándar para al menos un cáncer.

En una característica, el agente anti-cáncer es un agente que daña el ADN, un agente antimetabólico, y/o un agente antimetabolito. Por ejemplo, el agente que daña el ADN puede ser un agente alquilante, un inhibidor de topoisomerasa, o un intercalante de ADN. En una realización, el segundo agente es uno de carboplatino, doxorubicina, gemcitabina, docetaxel, o etopósido.

Los cánceres que pueden tratarse por los métodos de la invención incluyen aquellos que se sabe que están asociados con actividades aberrantes de la ruta de Stat3, que se listan anteriormente, y no se repiten aquí.

Como las células madre del cáncer son generalmente resistentes a radioterapia y quimioterapias convencionales, un fármaco dirigido a células madre del cáncer debería tener un efecto sinérgico cuando se usa en combinación con otras terapias anti-cáncer. Por lo tanto, según un tercer aspecto en esta descripción, un método para tratar cáncer en un sujeto incluye las etapas de: (a) administrar al sujeto una primera cantidad de un primer agente anti-cáncer para inhibir una población de células madre del cáncer (CSC); y (b) administrar al sujeto una segunda cantidad de un segundo agente anti-cáncer para inhibir una pluralidad de células de cáncer normales.

En varias realizaciones, la etapa (a) de este método inhibe la auto-renovación de al menos una CSC, y/o mata al menos una CSC. En una realización, la primera cantidad del primer agente anti-cáncer también mata a una pluralidad de células de cáncer normales. En una realización, la etapa (a) inhibe al menos parte de la actividad de la ruta de Stat3 en células madre del cáncer. El primer agente anti-cáncer comparte las mismas propiedades y características que el primer agente en los métodos según el primer aspecto, ya que esta descripción ha proporcionado evidencia de que los inhibidores de la ruta de Stat3 pueden inhibir eficazmente las CSC. Las características compartidas incluyen, por ejemplo, varias etapas de la ruta de Stat3 que pueden ser diana del primer agente anti-cáncer recitado aquí. En varias realizaciones, el primer agente anti-cáncer puede ser 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.

Los cánceres que pueden tratarse por este método son preferiblemente aquellos que se sabe o se confirma que contienen CSC, que incluyen, pero no están limitados a: cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, mieloma múltiple, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, melanoma, sarcoma de kaposi, sarcoma de ewing, cáncer de hígado, cáncer gástrico, meduloblastoma, tumores cerebrales, y leucemia.

El "segundo agente anti-cáncer" en los métodos según el tercer aspecto puede ser el mismo "segundo agente anti-cáncer" en los métodos según la invención, y no se repiten aquí todas las características compartidas.

En una realización, el segundo agente es un tratamiento de primera línea estándar para al menos un cáncer. El segundo agente puede ser un agente citotóxico. En una característica, el agente anti-cáncer es un agente que daña el ADN, un agente antimitótico, y/o un agente antimetabolito. Por ejemplo, el agente que daña el ADN puede ser un agente alquilante, un inhibidor de topoisomerasa, o un intercalante de ADN. En una realización, el segundo agente es uno de carboplatino, doxorubicina, gemcitabina, docetaxel, o etopósido.

Según un cuarto aspecto de esta descripción, se proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto, que comprende las etapas de: (a) administrar al sujeto una primera cantidad de un primer inhibidor de las células madre del cáncer para inhibir las actividades de la ruta de Stat3; y (b) administrar al sujeto una segunda cantidad de un segundo inhibidor de las células madre del cáncer para inhibir las actividades de una ruta diferente.

En una realización, el segundo inhibidor de las células madre del cáncer es lapatinib. En algunas realizaciones, la segunda cantidad del segundo agente anti-cáncer no es terapéuticamente eficaz frente a la población de células madre del cáncer en sí mismo. Los cánceres que pueden tratarse por este método son preferiblemente aquellos que se sabe o se confirma que contienen CSC y algunos ejemplos se listan anteriormente. En varias realizaciones, el cáncer es metastásico, refractario a tratamiento de cáncer de primera línea estándar, o de recaída.

Según la invención, se proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto, que comprende las etapas de: (a) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer agente anti-cáncer 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-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste; y (b) administrar un segundo agente anti-cáncer que no se selecciona del mismo grupo.

El segundo agente anti-cáncer puede ser cualquiera de los agentes descritos en otros aspectos de la invención, incluyendo cualquiera de los agentes citotóxicos o quimioterapéuticos, y cualquiera de los agentes dirigidos.

En un aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer agente anti-cáncer 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-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste; y una segunda terapia anti-cáncer seleccionada del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente dirigido, un agente de radioterapia, un agente biológico, un agente hormonal, un inhibidor de HDAC, un agente retinoide, un activador de punto de regulación, un inhibidor de proteasoma, un agente adyuvante, o un agente auxiliar.

En una realización, la composición incluye además un excipiente, vehículo, o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Otros aspectos incluyendo todas las composiciones y kits relacionados con los métodos descritos en la presente, 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**

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

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

La figura 3A muestra que Stat3 está constitutivamente activa en las células de la Población Lateral de Hoechst.

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

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

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

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

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

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

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

La figura 8B muestra que el compuesto 401 inhibe el nivel de expresión de los efectores corriente abajo de Stat3 en tejidos de tumor de xenoinjerto.

La figura 9A muestra la clasificación y el análisis de la Población Lateral de Hoechst.

20 La figura 9B muestra que la Población Lateral de Hoechst es tan sensible como la población no lateral frente al compuesto 401.

La figura 10A muestra que el compuesto 401 es apoptótico para las células de la Población Lateral de Hoechst.

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

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

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

La figura 13 muestra que el compuesto 401 inhibe la metástasis en el modelo ISMS.

La figura 14 muestra que el compuesto 401 tiene un efecto sinérgico con sorafenib en células de cáncer de pulmón humano A549.

30 La figura 15 muestra que el compuesto 401 tiene un efecto sinérgico con erlotinib en células de cáncer de pulmón humano A549.

La figura 16 muestra que el compuesto 401 tiene un efecto sinérgico con lapatinib en células de cáncer de pulmón humano A549.

35 La figura 17 muestra que el compuesto 401 tiene un efecto sinérgico con sutent en células de cáncer de pulmón humano A549.

La figura 18 muestra que el compuesto 401 tiene un efecto sinérgico con gemcitabina en un modelo de xenoinjerto pancreático humano Paca-2.

**Descripción detallada**

40 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 otra cosa. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células incluyendo mezclas de éstas.

Los términos "aislado" o "purificado", tal como se emplean en la presente, se refieren a un material que carece sustancialmente o esencialmente de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas químicas analíticas, tales como electroforesis

en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución.

Tal como se emplean en la presente, los términos “célula o células madre del cáncer” y “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 éstas. Las células madre del cáncer se definen y se caracterizan funcionalmente como una población de células que se origina 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 potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de realizar divisiones celulares simétricas para la auto-renovación o el auto-mantenimiento. Otras estrategias comunes para caracterizar a las CSC implican la morfología y el examen de los marcadores de la superficie celular, el perfil transcripcional, y la respuesta a fármacos. En la bibliografía científica, las CSC también se denominan células iniciadoras de tumor/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, células supervivientes a fármacos (DSC), células resistentes a fármacos (DRC) o células supermalignas.

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

Tal como se emplean en la presente, los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos en la 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 tanto las células no tumorigénicas, que comprenden la mayor parte de la población de células tumorales, como las células madre tumorigénicas (células madre del cáncer). Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no están limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, 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 varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

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

La “metástasis”, tal como se emplea en la presente, se refiere al proceso mediante el cual un cáncer se disemina o transfiere 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 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) incluyendo, pero no limitado a, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que será el receptor de un tratamiento particular. Típicamente, los términos “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente en la presente en referencia a un sujeto humano.

Los términos tales como “tratar” o “tratamiento” o “para tratar” o “aliviar” o “para aliviar”, tal como se emplean en la presente, se refieren tanto a 1) medidas terapéuticas que curan, frenan, disminuyen los síntomas de, y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado, como a 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen o ralentizan el desarrollo de una afección o trastorno patológico diana. Así, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno; aquellos propensos a padecer el trastorno; y aquellos en los que se quiere prevenir el trastorno. Un sujeto se “trata” con éxito según los métodos de la presente invención 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 de, o una ausencia de infiltración de células del cáncer en órganos periféricos incluyendo la diseminación del cáncer hacia tejidos blandos y hueso; la inhibición de, o una ausencia de metástasis tumoral; la inhibición o una ausencia de crecimiento tumoral; el alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; una morbilidad y mortalidad reducidas; y una mejora en la calidad de vida.

Tal como se emplean en la presente, el término “que inhibe”, “para inhibir” y sus equivalentes gramaticales, cuando se emplean en el contexto de una bioactividad, se refieren a la regulación a la baja de la bioactividad, que puede reducir o eliminar la función diana, tal como la producción de una proteína o la fosforilación de una molécula. En realizaciones particulares, la inhibición puede referirse a una reducción de aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ó 95% de la actividad diana. Cuando se emplean en el contexto de un trastorno o una enfermedad, los términos se refieren al éxito en la prevención del inicio de los síntomas, el alivio de los síntomas, o la eliminación de la enfermedad, afección o trastorno.

Las "células del cáncer normales", tal como se emplea en la presente bien en forma singular o plural, se refiere a células del cáncer que no son células madre del cáncer.

5 La terapia o tratamiento "de combinación" o "combinatorio", tal como se emplea en la presente significa la administración de al menos dos terapéuticos diferentes para tratar un trastorno, afección o síntoma, por ejemplo, una afección de cáncer. Dicha terapia de combinación puede implicar la administración de un terapéutico antes, durante, y/o después de la administración del otro terapéutico. Las administraciones de los terapéuticos pueden estar separadas en el tiempo por hasta varias semanas, pero más comúnmente por 48 horas, y lo más comúnmente por 24 horas.

10 El término "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 llevar o transportar el agente farmacéutico concreto desde un órgano, o parte del cuerpo, hacia otro órgano, o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir 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 carboximetil celulosa de sodio, etil celulosa 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 propileno glicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietileno glicol; 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; disoluciones de tampón fosfato; y otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas en las formulaciones farmacéuticas. En las composiciones también pueden estar presentes agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como lauril sulfato de sodio, estearato de magnesio y copolímero de 20 óxido de polietileno-óxido de polipropileno, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, agentes edulcorantes, saporíferos y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

30 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 las sales de éste, a menos que se indique otra cosa. El término "sal(es)", 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 tanto un resto básico, tal como pero no limitado a, una piridina o imidazol, como un resto ácido, tal como, pero no limitado a, un ácido carboxílico, pueden formarse iones bipolares ("sales internas") y se incluyen dentro del término "sal(es)", tal como se emplea en la presente. Se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables (es decir, no tóxicas, fisiológicamente aceptables), aunque otras sales también son 35 útiles, por ejemplo, en etapas de aislamiento o purificación 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 uno en el que la sal precipita o en un medio acuoso, seguido de liofilización.

40 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, hidratos.

#### *La Ruta de Stat3 como Diana*

45 La presente invención proporciona compuestos que son inhibidores eficaces de las actividades de la ruta de Stat3 (Ejemplo 2). Como la ruta de Stat3 es un factor de transcripción latente activado para estimular la proliferación, supervivencia y muchos otros procesos biológicos, está implicada en una amplia variedad de cánceres humanos así como trastornos no cancerosos incluyendo varias enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Tabla 1). De acuerdo con esto, la presente invención proporciona, en un primer aspecto, un tratamiento de combinación de trastornos asociados con la actividad aberrante, por ejemplo, sobreexpresada, de la ruta de Stat3. Específicamente, se administra al sujeto paciente una primera cantidad de un primer agente para inhibir al menos parte de la actividad aberrante de la ruta de Stat3 y también una segunda cantidad de un segundo agente que incluye un inhibidor de la transducción de la señal. En varias realizaciones, se inhibe parte (por ejemplo, 20%, 30%, 40%), la mayor parte (más de aproximadamente 50%), o sustancialmente toda (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ó 100%), de la actividad aberrante de la ruta de Stat3. Una o ambas de la primera cantidad y la segunda cantidad puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz del agente respectivo antes del uso de la combinación, es decir, cuando se usa en sí mismo contra el trastorno, o menos de esa cantidad debido a los efectos sinérgicos destacados de la combinación. El primer agente puede estar dirigido a una o múltiples etapas en la ruta de Stat3. En una realización, 55 el primer agente es el Compuesto de la Invención.

Tabla 1. Activación de la RUTA STAT3 en enfermedades humanas

ENFERMEDADES		REF.		
ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS	Tumores Sólidos	Cáncer de Mama	[40]	
		Cáncer de Cabeza y Cuello (SCCHN)	[41]	
		Cáncer de Pulmón	[42]	
		Cáncer de Ovario	[43]	
		Cáncer Pancreático	[44]	
		Carcinoma Colorrectal	[45]	
		Cáncer de Próstata	[46]	
		Carcinoma de Células Renales	[47]	
		Melanoma	[48]	
		Carcinomas Hepatocelulares	[36]	
		Cáncer Cervical	[49]	
		Cáncer Endometrial	[49]	
		Sarcomas	[50, 51]	
		Tumores Cerebrales	[52]	
	Cánceres Gástricos	[29]		
	Tumores Hematológicos	Mieloma Múltiple	[53]	
		Leucemia	Leucemia dependiente de HTLV-1	[54]
			Leucemia Mielógena Crónica	[47]
			Leucemia Mielógena Aguda	[55]
			Leucemia de Linfocitos Granulares Grandes	[56]
Linfomas		de Burkitt/relacionado con EBV	[57]	
		Micosis fungoides	[47]	
		Dependiente de Saimiri HSV (células T)	[47]	
		Linfoma de células T Cutáneo	[58]	
		Enfermedades de Hodgkin	[47]	
Linfoma de células Grandes Anaplásico	[59]			
ENFERMEDADES INMUNES	Enfermedades inflamatorias	Enfermedades Inflamatorias del Intestino	[60]	
		Artritis Inflamatoria	[61-63]	
		Enfermedades de Crohn	[64]	
		Afecciones Inflamatorias Crónicas	[65]	
	Autoinmunes	Artritis reumatoide	[61, 62, 66-68]	
		Lupus Eritematoso Sistémico	[69]	

	Asma	[70]
	Alergia	[71]
	Infecciones	[72]
TRASTORNOS PROLIFERATIVOS	Psoriasis	[73]
	Queloides	[74]
	Verrugas	[75]
	Síndrome Mielodisplásico	[76]
	Policitemia vera	[77]
ENFERMEDADES DEL SNC	Enfermedad de Alzheimer	[38, 78, 79]
	Esclerosis múltiple (MS)	[38, 78, 80]

- El segundo agente, es decir, un inhibidor de la transducción de la señal, puede usarse para tomar como diana una ruta diferente, una ruta relacionada o una etapa diferente en la misma ruta de Stat3 de la inhibida por el primer agente. Normalmente, cuando los dos agentes en la terapia de combinación están dirigidos a la misma ruta, no obstante a diferentes etapas, la cantidad esperada del sinergismo es limitada. Sin embargo, los datos proporcionados más adelante en el Ejemplo 5 muestran cantidades sorprendentemente altas de sinergismo entre el Compuesto de la Invención y un segundo agente que presumiblemente está dirigido a otras etapas en la misma ruta, por ejemplo agentes dirigidos a tirosina quinasas y GFR, lo que sugiere que funciona un mecanismo inesperado de inhibición.
- 5 Específicamente, Stat3 se activa por la fosforilación de un residuo de tirosina crítico por tirosina quinasas de receptores de factores de crecimiento, quinasas Janus, o las quinasas de la familia Src, etc; después de la fosforilación de tirosina, Stat3 forma homodímeros, se transloca al núcleo, se une a elementos de respuesta del ADN específicos en las regiones de promotores de los genes diana, e induce la expresión génica. El Ejemplo 2 de la presente invención muestra que en la ruta de Stat3, el efecto inhibitorio del Compuesto de la Invención es evidente por la etapa de unión a ADN. Además, como dicho efecto se encuentra en Stat3 activada constitutivamente, es probable, que el Compuesto de la Invención inhiba la dimerización y/o translocación nuclear de la proteína Stat3. Por lo tanto, cuando se combina con agentes dirigidos a tirosina quinasas (TKI) y GFR que también están dirigidos a la misma ruta de Stat3, la cantidad de sinergismo observada fue sorprendentemente alta. Por ejemplo, se consiguió el 100% de la inhibición de células de una línea de células de cáncer pancreático cuando el Compuesto 401 se combinó con el TKI Sorafenib, mientras tanto el Compuesto 401 como Sorafenib sólo pudieron conseguir un 66% de inhibición de la misma línea de células cuando se administraron individualmente-se sabe que el cáncer pancreático implica la sobreexpresión de Stat3 [44]. De hecho, los cuatro TKI ensayados en combinación con el Compuesto 401 mostraron un sinergismo marcado. En realizaciones preferidas de la invención, el tratamiento de combinación consigue más de aproximadamente 50%, ó 70%, ó 90% de inhibición de las células de cáncer.
- 10 Los métodos según este primer aspecto de la descripción pueden aplicarse al tratamiento de cánceres o trastornos no cancerosos, preferiblemente aquellos que se sabe que están asociados con actividades aberrantes de la ruta de Stat3. Los ejemplos de trastornos no cancerosos asociados con actividades aberrantes de la ruta de Stat3 incluyen pero no están limitados a: enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades intestinales inflamatorias, artritis, asma, y lupus eritematoso sistémico, trastorno de desmielinación autoinmune, enfermedad de Alzheimer, ictus, lesión por reperfusión tras isquemia y esclerosis múltiple. Los ejemplos de cánceres asociados con actividades aberrantes de la ruta de Stat3 incluyen pero no están limitados 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.
- 15 El segundo agente según este primer aspecto de la descripción puede ser un agente dirigido, por ejemplo, un agente dirigido a un receptor de factor de crecimiento (véanse los datos de erlotinib (tarceva) en el Ejemplo 5), un agente dirigido a quinasa (véanse los datos de lapatinib, erlotinib, sunitinib y sorafenib en el Ejemplo 5) o un inhibidor de la angiogénesis (véanse los datos de sunitinib y sorafenib en el Ejemplo 5).
- 20 En una realización, el segundo agente es un agente dirigido a un receptor de factor de crecimiento, por ejemplo, un anticuerpo dirigido a un receptor de factor de crecimiento asociado con una quinasa, tal como el Receptor del Factor Crecimiento Epidérmico (EGFR) o el Receptor del Factor Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGFR). Por ejemplo, el agente dirigido puede ser gefitinib (Iressa), erlotinib (tarceva), PD153035, cetuximab (erbitux), avastina, panitumumab, trastuzumab, y anticuerpo anti-c-Met.
- 25
- 30
- 35
- 40

En una realización, el segundo agente es un agente dirigido a quinasa, que puede ser un inhibidor de quinasa tal como un inhibidor de tirosina quinasa (TKI). Por ejemplo, el TKI puede ser erlotinib (Tarceva), sunitinib (sunitinib), lapatinib, sorafenib (nexavar), vandetanib, axitinib, bosutinib, cedivanib, dasatinib (sprycel), gefitinib (irressa), imatinib (gleevec), lestaurinib, y/o ARQ197.

- 5 En varias realizaciones, el agente dirigido a quinasa es uno de los siguientes: gefitinib (irressa), ZD6474 (AZD6474), EMD-72000 (matuzumab), panitumab (ABX-EGF), ICR-62, CI-1033 (PD183805), lapatinib (tykerb), AEE788 (pirrolopirimidina), EKB-569, EXEL 7647/EXEL 0999, erlotinib (tarceva), imatinib (gleevec), sorafinib (nexavar), sunitinib (sutent), dasatinib (sprycel), vandetinib (ZACTIMA), temsirolimus (torisel), PTK787 (vatalanib), pazopanib, AZD2171, everolimus, seliciclib, AMG 706, axitinib, PD0325901, PKC-412, CEP701, XL880, bosutinib, BIBF1120, BIBF1120, nilotinib, AZD6244, HKI-272, MS-275, BI2536, GX15-070, AZD0530, enzastaurina, MLN-518, y ARQ197.

- 10 En una realización, el segundo agente es un inhibidor de la angiogénesis que puede ser uno de los siguientes: CM101, IFN- $\alpha$ , IL-12, factor de plaquetas 4, suramina, SU5416, tromboespondina, antagonistas de VEGFR, esteroides angiostáticos más heparina, Factor Inhibidor de la Angiogénesis Derivado de Cartílago, inhibidores de la metaloproteinasas de matriz, batimastat, marimastat, angiostatina, endostatina, 2-metoxiestradiol, tecogalán, tromboespondina, inhibidores de  $\alpha$ V $\beta$ 3, linomida, y ADH-1.

- 15 En un segundo aspecto relacionado, la presente descripción proporciona un método para tratar a un sujeto de un cáncer que está asociado con la actividad aberrante de la ruta de Stat3, comprendiendo el método las etapas de: (a) administrar al sujeto una primera cantidad de un primer agente para inhibir al menos parte de la actividad aberrante de la ruta de Stat3; y (b) administrar al sujeto una segunda cantidad de un segundo agente anti-cáncer. Los cánceres que pueden tratarse con este método incluyen aquellos que se sabe que están asociados con, por ejemplo, causados al menos parcialmente por, actividades aberrantes de la ruta de Stat3, una lista de los cuales se proporciona anteriormente respecto al primer aspecto de la invención.

- 20 Aunque las características respecto al primer agente pueden ser similares a las descritas respecto al primer aspecto de la invención, el segundo agente anti-cáncer puede ser un agente citotóxico, o un agente quimioterapéutico. En una realización, el segundo agente es un tratamiento de primera línea estándar para al menos un cáncer. La cantidad del primer agente y segundo agente usada en el método puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz del agente respectivo antes del uso de combinación o menor.

- 25 En una característica, el agente anti-cáncer es un agente que daña el ADN, un agente antimetabólico, y/o un agente antimetabólico. El agente que daña el ADN puede ser un agente alquilante, un inhibidor de topoisomerasa, y/o un intercalante de ADN. Como se muestra en el Ejemplo 5, el Compuesto 401 de la presente invención se añadió a células de cáncer pancreático Paca2 junto con cada uno de los siguientes: carboplatino (un agente alquilante del ADN), etopósido (inhibidor de la topoisomerasa II), doxorubicina (un intercalante de ADN), docetaxel (un agente anti-mitótico), y Gemzar/gemcitabina (un agente anti-metabólico). En cada combinación se encontró una cantidad significativa de sinergismo. Por ejemplo, se consiguió 96% de inhibición de las células de cáncer pancreático cuando el Compuesto 401 se combinó con Gemzar/gemcitabina mientras el Compuesto 401 y Gemzar sólo consiguieron respectivamente 66% y 36% de inhibición en la misma línea de células cuando se administraron individualmente.

- 30 El agente alquilante puede ser uno de los siguientes: clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina, melfalán, mostaza de uracilo, tiotepa, busulfán, carmustina, lomustina, estreptozocina, carboplatino, cisplatino, satraplatino, oxaliplatino, altretamina, ET-743, XL119 (becatecarina), dacarbazina, clormetina, bendamustina, trofosfamida, uramustina, fotemustina, nimustina, prednimustina, ranimustina, semustina, nedaplatino, tetranitrato de triplatino, manosulfán, treosulfán, temozolomida, carbocina, triazicua, trietilenmelamina, y procarbazona.

- 35 El inhibidor de topoisomerasa puede ser uno de los siguientes: doxorubicina (doxil), daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, antracendiona (novantrona), mitoxantrona, mitomicina C, bleomicina, dactinomicina, plicatomicina, irinotecán (camptosar), camptotecina, rubitecán, belotecán, etopósido, tenipósido, y topotecán (hicamptina).

- 40 El intercalante de ADN puede ser proflavina, doxorubicina (adriamicina), daunorrubicina, dactinomicina, y talidomida.

El agente antimetabólico puede ser uno de los siguientes: paclitaxel (abraxano)/taxol, docetaxel (taxotere), BMS-275183, xiotax, tocosal, vinorelbina, vincristina, vinblastina, vindesina, vinzolidina, etopósido (VP-16), tenipósido (VM-26), ixabepilona, larotaxel, ortataxel, tesetaxel, e ispinesib.

- 45 El agente antimetabólico puede ser uno de los siguientes: fluorouracilo (5-FU), floxuridina (5-FUdR), metotrexato, xeloda, arranón, leucovorina, hidroxiaurea, tioguanina (6-TG), mercaptopurina (6-MP), citarabina, pentostatina, fosfato de fludarabina, cladribina (2-CDA), asparaginasa, gemcitabina, pemetrexed, bortezomib, aminopterina, raltitrexed, clofarabina, encitabina, sapacitabina, y azacitidina.

- 50 En una realización, el segundo agente anti-cáncer es uno de los siguientes: carboplatino, doxorubicina, gemcitabina, docetaxel, y etopósido. Como este método inhibe la ruta de Stat3, que en la presente se ha probado que es crítica tanto para la auto-renovación como la supervivencia de las CSC (véanse los datos en el Ejemplo 1), y se ha encontrado que las CSC son fundamentalmente responsables de resistencia a fármacos, recidiva y metástasis

tumorales, en realizaciones preferidas, este método se usa para tratar o prevenir un cáncer refractario, cáncer recidivante y/o cáncer metastásico.

Pueden encontrarse discusiones adicionales de quimioterapia y terapia biológica anti-cáncer, y ejemplos de protocolos terapéuticos adecuados, en libros tales como *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*, 3ª ed. (2001), Chabner y Longo, eds., y *Handbook of Cancer Chemotherapy*, 6ª ed. (2003), Skeet, ed., ambos de Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pa., E.E.U.U; y pueden encontrarse regímenes para terapias anti-cáncer, especialmente quimioterapias, en sitios Web tales como los mantenidos por el National Cancer Institute ([www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)), la American Society for Clinical Oncology ([www.asco.org](http://www.asco.org)), y la National Comprehensive Cancer Network ([www.nccn.gov](http://www.nccn.gov)).

#### 10 *Las células madre del cáncer como diana*

La presente descripción también proporciona tanto datos *in vitro* como *in vivo* de que el Compuesto de la Invención inhibe la auto-renovación de las CSC y es apoptótico para las CSC (Ejemplo 3). Además, la presente invención confirma empíricamente la eficacia del Compuesto de la Invención frente al cáncer metastásico (Ejemplo 4).

El propósito de la terapia del cáncer (terapia anti-cáncer) es evitar que las células de cáncer se multipliquen, invadan, metastaticen, y finalmente maten a su organismo huésped, por ejemplo, un ser humano u otros mamíferos. Como la multiplicación celular es una característica de muchas células normales así como células del cáncer, la mayor parte de las terapias anti-cáncer existentes también tienen efectos tóxicos en células normales, particularmente aquellas con una velocidad de recambio rápida, tales como células de la médula ósea y de la membrana mucosa. Por lo tanto, una terapia de cáncer eficaz necesita tener un efecto inhibitorio o controlador del crecimiento marcado en las células del cáncer a la vez que ejerce un efecto tóxico mínimo en las células normales del huésped.

Como los primeros compuestos anti-cáncer eficaces se introdujeron en ensayos clínicos en los años 40, la recidiva del cáncer y la resistencia a fármacos han permanecido como algunos de los mayores problemas en el tratamiento del cáncer. Frecuentemente, pueden obtenerse regresiones de los síntomas, pero las respuestas son frecuentemente parciales y sólo de corta duración, y los cánceres recidivantes tienden a ser resistentes al fármaco original. Esto puede explicarse ahora por la existencia de células madre del cáncer (CSC). Como se ha descrito anteriormente, esta minúscula población de células en la masa completa del cáncer puede escapar de los fármacos y radioterapias que son eficaces en el resto de las células del cáncer porque las CSC comparten probablemente la misma clase de mecanismos biológicos con las células madre somáticas normales, que son naturalmente resistentes a la mayor parte, si no todos, los agentes quimioterapéuticos. Siendo la raíz verdadera de las actividades tumorigénicas en las masas de cáncer, las CSC pueden volver a promover el recrecimiento del cáncer o causar metástasis si no se tratan. Como el tratamiento inicial sólo deja células madre del cáncer resistentes a fármacos, las posibilidades de que el tumor recedido o metastásico completo se vuelva resistente a la terapia inicialmente "eficaz" se ha incrementado dramáticamente.

Actualmente, las terapias anti-cáncer se usan en combinación por varias razones. En primer lugar, el tratamiento con dos o más terapias sin resistencia cruzada puede evitar la formación de clones resistentes en el tumor. La resistencia a un fármaco anti-cáncer, por ejemplo, un compuesto anti-cáncer de platino tal como cisplatino, está asociada frecuentemente con resistencia cruzada a otros fármacos de la misma clase, por ejemplo, otros compuestos de platino. Además, también existe resistencia a múltiples fármacos, también denominada resistencia a fármacos pleiotrópica, en la que el tratamiento con un fármaco confiere resistencia no sólo a ese fármaco y otros de su clase sino también a agentes no relacionados. En segundo lugar, la combinación de dos o más terapias que son activas frente a células en diferentes fases de crecimiento puede matar a las células que se están dividiendo lentamente así como a las que se están dividiendo activamente y/o reclutar células en un estado de división más activa, haciéndolas más sensibles a múltiples terapias anti-cáncer. Y, en tercer lugar, la combinación puede crear un efecto de potenciación bioquímica afectando a diferentes rutas diferentes o diferentes etapas en una única ruta bioquímica.

Estos razonamientos para el tratamiento anti-cáncer combinatorio no han tenido en cuenta los avances recientes respecto a la confirmación y caracterización de las células madre del cáncer. El fracaso en la incorporación de una terapia específica de CSC en la terapia de combinación podría explicar por qué las terapias de combinación actuales no pueden curar los cánceres comunes tales como cáncer de colon metastásico y cáncer de próstata. Con los datos proporcionados en la presente que confirman la eficacia del Compuesto de la Invención frente a las CSC (Ejemplo 3), la presente invención es capaz de considerar un método de tratamiento del cáncer que combina un agente dirigido a CSC y otro agente dirigido a células del cáncer normales. Además, aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría particular, la presente invención proporciona un régimen de fármacos que se adelanta al escenario, que ahora está apoyado por algunos datos preliminares, en el que algunas células del cáncer normales, que no han sido tratadas o tratadas insuficientemente, revierten o dan lugar a las CSC al deplecionarse las CSC originales por una terapia de un único fármaco dirigido sólo a las CSC.

Como las células madre del cáncer son resistentes generalmente a radioterapia y quimioterapias convencionales, un fármaco dirigido a células madre del cáncer debería tener un efecto sinérgico cuando se usa en combinación con

otras terapias anti-cáncer. Por lo tanto, la presente descripción proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto, que comprende las etapas de: (a) administrar al sujeto una primera cantidad de un primer agente anti-cáncer para inhibir una población de células madre del cáncer; y (b) administrar al sujeto una segunda cantidad de un segundo agente anti-cáncer para inhibir una pluralidad de células del cáncer normales.

- 5 En varias realizaciones, se inhiben parte (por ejemplo, 20%, 30%, 40%), la mayor parte (más de aproximadamente 50%), o sustancialmente todas (por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ó 100%), de las CSC. Una o ambas de la primera cantidad y la segunda cantidad puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz del agente respectivo antes del uso de la combinación, es decir, cuando se usa en sí mismo contra el cáncer, o menor de esa cantidad debido a los efectos sinérgicos destacados de la combinación. El primer agente es el Compuesto de la Invención, concretamente, 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-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.

- 15 El "segundo agente anti-cáncer", seleccionado del grupo definido en las reivindicaciones, puede ser el mismo "segundo agente anti-cáncer" en los métodos descritos anteriormente, y no se repiten aquí todas las características compartidas. En una característica, el segundo agente anti-cáncer es un agente que daña el ADN, un agente antimetabólico, y/o un agente antimetabolito. Por ejemplo, el agente que daña el ADN puede ser un agente alquilante, un inhibidor de topoisomerasa, o un intercalante de ADN. Las listas de agentes alquilantes, inhibidores de topoisomerasa, intercalantes de ADN, agentes antimetabólicos, y agentes antimetabolito adecuados se listan anteriormente y no se repiten aquí. Se observó un sinergismo significativo en los experimentos de inhibición del cáncer en los que el Compuesto de la Invención se usa en combinación con cada una de las clases anteriores de agentes quimioterapéuticos (véase el Ejemplo 5). En una realización, el segundo agente es uno de carboplatino, doxorubicina, gemcitabina, docetaxel, y etopósido.

- 25 En otra característica, el segundo agente anti-cáncer seleccionado del grupo definido en las reivindicaciones es un agente dirigido, por ejemplo, un agente dirigido a un receptor de factor de crecimiento (véanse los datos de erlotinib (tarceva) en el Ejemplo 5), un agente dirigido a quinasa (véanse los datos de lapatinib, erlotinib, sunitinib y sorafenib en el Ejemplo 5) o un inhibidor de la angiogénesis (véanse los datos de sunitinib y sorafenib en el Ejemplo 5). Se observó un sinergismo significativo en los experimentos de inhibición del cáncer en los que el Compuesto de la Invención se usa en combinación con cada una de las clases anteriores de agentes dirigidos. Las listas de agentes dirigidos a un receptor de factor de crecimiento, agentes dirigidos a quinasa (especialmente TKI), e inhibidores de la angiogénesis adecuados se listan anteriormente y no se repiten aquí.

- 30 Como este método emplea un agente terapéutico dirigido específicamente a células CSC en el tumor, que son fundamentalmente responsables de la resistencia a fármacos, recidiva tumoral y metástasis, en realizaciones preferidas, este método se usa para tratar o prevenir un cáncer refractario, cáncer recidivante y/o cáncer metastásico.

- 35 Tomando como diana las CSC con un tratamiento de combinación, una estrategia debería tener como objetivo tomar como diana más de una ruta que está implicada en las funciones biológicas críticas de las CSC tales como auto-renovación y supervivencia. Para este fin, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto que incluye las etapas de: (a) administrar al sujeto una primera cantidad de un primer inhibidor de las células madre del cáncer para inhibir las actividades de la ruta de Stat3; y (b) administrar al sujeto una segunda cantidad de un segundo inhibidor de las células madre del cáncer para inhibir las actividades de una ruta diferente. En una realización, la cantidad del primer y/o segundo agente anti-cáncer en este método no es terapéuticamente eficaz frente a la población de células madre del cáncer por sí mismo-pero debido al sinergismo significativo conseguido a través de la combinación, es posible usar una cantidad menor en este método con el fin de incitar una respuesta del paciente.

- 45 En una realización, el segundo agente anti-células madre del cáncer es lapatinib (INN) o ditosilato de lapatinib (USAN), que fue aprobado por la FDA en 2007 para uso en pacientes con cáncer de mama metastásico avanzado. El lapatinib es un inhibidor de tirosina quinasa que compite con el ATP dual del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y HER2/neu (ErbB-2). Inhibe la autofosforilación del receptor y la activación por unión al bolsillo de unión del ATP del dominio proteína quinasa de EGFR/HER2. Los datos presentados en el Ejemplo 5 más adelante muestran que se consiguió un sinergismo marcado frente a células de cáncer pancreático Paca2: la proporción de inhibición de la pre-combinación para el Compuesto 401 y lapatinib fueron respectivamente 32% y 27% mientras la proporción de inhibición después de la combinación se disparó hasta 74%, mayor que la suma de las dos proporciones. Como este método presta una atención adicional a las CSC, que son fundamentalmente responsables de la resistencia a fármacos, la recidiva y las metástasis tumorales, en realizaciones preferidas, este método se usa para tratar o prevenir un cáncer refractario, cáncer recidivante y/o cáncer metastásico.

- 60 Las formulaciones de la presente invención 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 muy conocidos en la técnica farmacéutica. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material vehicular para producir una forma de dosificación unitaria variará dependiendo del mamífero que se está tratando y

del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo, que puede combinarse con un material vehicular 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%.

#### 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.

Tabla 2

Nombre del Compuesto	Código del Compuesto
2-(1-hidroxiethyl)-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-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona	101

**Cultivo Celular:** 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 por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS) (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA) y 5% penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Invitrogen).

**Población Lateral de Hoechst:** Para identificar y aislar las fracciones de población lateral (SP) y no SP, 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 por Dulbecco (DMEM) que contenía 2% FBS y 1 mM HEPES. Las células se marcaron con Hoechst 33342 (Invitrogen) a una concentración de 5 µg/mL. Las células marcadas se incubaron durante 120 minutos a 37°C, bien solas o con 50 µM verapamilo (Sigma-Aldrich, St. Louis). Después de la tinción, las células se suspendieron en disolución salina equilibrada de Hank (HBSS; Invitrogen) que contenía 2% FBS y 1 mM HEPES, se pasaron a través de un filtro de malla de 40 µm, y se mantuvieron a 4°C hasta el análisis de la citometría de flujo. El tinte de Hoechst se excitó a 350 nm y su fluorescencia se midió 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 frontal no fue rigurosa, y solo se excluyeron los restos celulares [15].

**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. [21], con una ligera modificación. Las células CD133<sup>+</sup> se aislaron bien mediante separación de células activada por fluorescencia (FACS) o separación basada en nanopartículas magnéticas. Brevemente, 10<sup>7</sup> células/mL se marcaron con CD133/1 (AC133)-PE para la separación 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 2% FBS y 1 mM EDTA. 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 separación mediante FACS.

Las células CD44<sup>alto</sup> se aislaron mediante FACS según los métodos descritos en Ponti et al., con una ligera modificación [81]. 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 2% FBS y 1 mM EDTA a 1 x 10<sup>6</sup> células/mL. Las células se incubaron sobre hielo con una dilución 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 pasaron a través de un tamiz de 40 µm antes de la separación.

**Ensayo de esferas:** Un método fiable para medir la capacidad auto-renovadora de una población celular es la capacidad de ser cultivadas como esferas en ausencia de suero o adherencia. Se cultivaron células madre del cáncer de población lateral de Hoechst o CD44<sup>alto</sup> FaDu en placas con una adherencia ultra baja en medio de células madre del cáncer (DMEM/F12, suplemento Neurobasal B27, 20 ng/mL EGF, 10 ng/mL FGF, 4 µg/mL insulina y 0,4% BSA) para permitir la formación de esferas. Típicamente, la formación de esferas se evaluó mediante microscopía después de 10-14 días en cultivo y se puntúan las esferas con >50 células.

**Ensayo Informador de Luciferasa:** Se co-transfectaron células HeLa con un vector informador Stat3-luciferasa (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 0,5% FBS durante 24 horas. Las células después se trataron con el compuesto indicado durante 30 minutos antes de la adición de 25 ng/ml oncostatina M (OSM) (R&D Systems, Minneapolis, MN) al medio. 6 horas después de la adición de OSM, las células se recogieron 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 con o sin el compuesto se recogieron 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 para Anexina-V mediante una citometría de flujo.

**Ensayo de Unión a 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 pre-incubaron 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 un 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 enzima (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 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). El anticuerpo unido después se visualizó mediante la adición de sustrato 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 sembraron en placas de 96 pocillos a 10.000 células por pocillo. 24 horas después de la siembra en placas, se añadió el compuesto a las células en las dosis indicadas. 22 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 adicionales a 37°C. Después, el medio se aspiró y el producto formazán 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 un tiempo indicado se fijaron bien en 4% formaldehído o metanol frío para la detección de la Anexina-V, la caspasa 3 escindida, 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, 5% FBS) durante 10 min 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 policlonal anti-caspasa 3 escindida (1:100) se obtuvo en Cell Signaling Technology, Danvers, MA. La anexina-V-FITC se obtuvo en Roche, Penzberg, Alemania. El anticuerpo policlonal anti-Stat3 se obtuvo de 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 ARNs codificado por los plásmidos TPIV® y procesado por las bacterias se libera en el 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 compartida no. PCT/US08/68866, presentada el 30 de junio de 2008. De modo específico, se construyó un plásmido TPIV® que codifica secuencias de ARNs 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 (inserto de 300 pb)**

Cebadores:

Stat3 TPIV Dir 5'-GGATCTAGAATCAGCTACAGCAGC (SEQ ID NO. 2)

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

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

**TPIV-GL2 (inserto de 300 pb)**

Cebadores:

GL2 TPIV Dir 5'- CCCTCTAGATGGTTCCTGGAAC (SEQ ID NO. 4)

GL2 TPIV Inv 5'-GCTCTAGAAACCCCTTTTGG (SEQ ID NO. 5)

- 10 Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pLYSe (50-100  $\mu$ l) químicamente competentes con un control ó 100ng 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 100  $\mu$ g/ml ampicilina y se creció durante la noche a 37°C. Al día siguiente, 5 ml de cada cultivo desarrollado durante la noche se diluyeron 1:40 en medio BHI fresco que contenía 100  $\mu$ g/ml ampicilina 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 x 10<sup>8</sup> 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 2.000:1, bacterias a células) en un volumen de reacción apropiado. Por regla general, debe elegirse el volumen de reacción que produzca 3 x 10<sup>8</sup>/ml para una MOI 1.000:1. El volumen requerido de cultivo de bacterias después se centrifugó a 2.500 g durante 10 min a 4°C y el sedimento se lavó una vez con medio de cultivo sin suero que se empleó para que las células se bactoefecten, 100  $\mu$ g/ml más ampicilina y 1 mM IPTG, y se resuspendió en el mismo medio a la densidad requerida para la infección bacteriana (bactofección).

- 25 Al mismo tiempo, se aíslan células de cáncer o células madre del cáncer. 30 minutos antes de la bactoefcción, el medio de cultivo celular se reemplazó por 2 ml de medio sin suero fresco que contenía 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 1 mM IPTG. 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 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 150  $\mu$ g/ml de gentamicina 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 10  $\mu$ g/ml de ofloxacin para matar a las bacterias intracelulares. Las células después se recogieron o se analizaron a varios puntos de tiempo con el fin de evaluar el grado de silenciamiento del gen diana y los fenotipos resultantes.

- 40 **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 consideró tóxico. Los resultados se expresan como volumen tumoral medio (mm<sup>3</sup>)  $\pm$  EE. Los valores de P < 0,05 se consideran estadísticamente relevantes.

- 45 **Mantenimiento de los Animales:** Se aclimataron ratones desnudos atímicos machos o hembras de 4-5 semanas (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) a las instalaciones de mantenimiento de animales durante al menos 1 semana antes del inicio del estudio. Todos los procedimientos experimentales utilizados fueron consistentes con las directrices indicadas por la American Physiology Society y la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, y también fueron aprobadas por el Institutional Animal Care and Use Committee de Boston Biomedical Inc. Los animales se alojaron en grupos de cuatro en jaulas con lecho de virutas de madera 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.

- 50 **Sistema del modelo de ratón desnudo intraesplénico (modelo ISMS):** Se anestesiaron ratones desnudos hembras y, bajo condiciones asépticas, se realizó una incisión en el flanco izquierdo para exponer el bazo. Se inyectó un millón de 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 del implante hasta el día del examen. El régimen de los tratamientos es 5qd/semana por ruta i.p. Los ratones se sacrificaron cuando estaban moribundos ó 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 una Diana Anti-Células Madre del Cáncer

5 La inactivación de Stat3 en las CSC induce la apoptosis. Para determinar si las células madre del cáncer expresaban Stat3 y si Stat3 estaba constitutivamente activa, realizamos una microscopía de inmunofluorescencia, que permite no sólo el análisis de poblaciones celulares raras, sino que también proporciona información adicional sobre la localización de proteínas y la capacidad de correlacionar la tinción con el fenotipo (es decir, 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, determinamos que Stat3 en efecto estaba presente en células SP y que se encontraba modestamente enriquecida en el núcleo (Figura 3A). Además, también observamos una tinción incrementada 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.

10 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.

15 A continuación, ensayamos el efecto de la inactivación de Stat3 en las CSC utilizando TPIV<sup>®</sup>. El análisis de inmunofluorescencia reveló que puede lograrse una depleción significativa de Stat3 en 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 experimentaron apoptosis en 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.

20 **La inactivación de Stat3 en las CSC inhibe la esferogénesis de CSC:** Se aislaron células madre del cáncer de población lateral de Hoeschst o FaDu CD44<sup>alt</sup>/CD24<sup>bajo</sup> mediante FACS, y se cultivaron en placas de adherencia ultra baja en medio de células madre del cáncer (DMEM/F12, suplemento Neurobasal B27, 20 ng/mL EGF, 10 ng/mL FGF, 4 µg/mL insulina, y 0,4% BSA) para permitir la formación de esferas. Las esferas primarias se recogieron, se disgregaron con tripsina, y se distribuyeron en placas de 96 pocillos de adherencia ultra baja antes del tratamiento con TPIV<sup>®</sup>. Las bacterias se administraron a una MOI de 1.000 durante dos horas antes de la adición de un cóctel de antibióticos (penicilina/estreptomicina, gentamicina, oflaxacina). La formación de esferas se evaluó después de 10-14 días en cultivo. Se capturaron imágenes representativas de las esferas antes (Figura 5, paneles superiores izquierdos) o después de la adición de azul de tripán para identificar a las células muertas (Figura 5, panel inferior izquierdo). La esferogénesis relativa se mostró en el panel derecho de la Figura 5. Los datos mostraron claramente que la inactivación de Stat3 en células madre del cáncer inhibe la esferogénesis, lo cual demuestra que Stat3 es un factor de auto-renovación clave de las células madre del cáncer.

#### Ejemplo 2

##### Identificación de compuestos que inhiben la actividad de la ruta de Stat3

25 **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 informadora 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 25 ng/ml oncostatina M (OSM) durante 6 horas, seguido de la detección de la actividad informadora de Stat3-luc. La incubación de las células con el compuesto 401 inhibió la actividad informadora de Stat3 estimulada por OSM (Figura 6, panel izquierdo). Se incluyó AG490, un inhibidor conocido de la ruta de Jak-Stat, como un 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 informadora de Stat3 estimulada por OSM incluso a una concentración mucho mayor (Figura 6, panel derecho).

30 Se ensayaron compuestos adicionales en los ensayos de informador Stat3 luciferasa y los resultados se resumen en la Tabla 3.

50

Tabla 3

Compuesto nº	CI <sub>50</sub> en los ensayos de Stat3-Luc
401	~ 0,25 µM
416	~ 0,75 µM
418	~ 0,75 µM
301	~ 2 µM

5 **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 EMSA de Stat3 para monitorizar 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 monitorizó mediante electroforesis en gel y 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 10 de incubar la sonda marcada con el compuesto 401 (Figura 7A, panel derecho).

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

15 **Inhibición de los efectores aguas 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 recogida. Las muestras se analizaron mediante transferencias Western y EMSA para evaluar el nivel de expresión de los efectores aguas 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 resultó en una disminución en el nivel de expresión de los efectores 20 aguas abajo de Stat3 ciclina D1 y survivina (Figura 8B).

### Ejemplo 3

#### Identificación de Compuestos Dirigidos a las Células Madre del Cáncer

25 **Identificación de compuestos que son apoptóticos para células madre del cáncer.** Puesto que se ha demostrado que las células madre del cáncer expelen activamente Hoechst, se tiñeron células SW480 con Hoechst y se extrajo la población lateral (mostrado en la Figura 9A, área delimitada en el panel izquierdo) para enriquecer las células madre del cáncer. Para confirmar que esta población lateral está enriquecida con células madre del cáncer, primero se trató un conjunto control de células SW480 con Verapamilo, un inhibidor de los transportadores ABC, antes de teñir con Hoechst. Tal como se muestra en el panel derecho de la Figura 9A, el tratamiento con Verapamilo resulta en la pérdida de la población lateral.

30 Se determinó la CI<sub>50</sub> del compuesto 401 contra la población lateral de Hoechst en los ensayos MTT y se comparó con la CI<sub>50</sub> contra la población no lateral. Los resultados muestran que la población lateral es tan sensible como la población no lateral al compuesto 401 (Figura 9B, paneles derechos). Sin embargo, la población lateral es mucho más resistente que la población no lateral a la doxorubicina (Figura 9B, paneles izquierdos), lo cual es consistente con las publicaciones previas [7, 82]. Estos datos sugieren que el compuesto 401 mata a las células madre del 35 cáncer.

Las células de la población lateral 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 muestran que las células moribundas son positivas para Anexina V (Figura 10A), lo cual demuestra que el compuesto 401 es apoptótico para las células madre del cáncer.

40 Alternativamente, realizamos una extracción con lechos magnéticos 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 escindida (una característica de la apoptosis). Tal como se muestra en la Figura 10B, muchas de las células CD133<sup>+</sup> se convierten en positivas para Caspasa 3 escindida después del tratamiento con el 45 compuesto 401, lo cual corrobora que el compuesto 401 es apoptótico para las células madre del cáncer.

**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 auto-renovarse. Un método fiable para medir la capacidad de

auto-renovación de poblaciones celulares es la capacidad de ser cultivadas como esferas en ausencia de suero o adherencia. Para comparar la capacidad del compuesto 401 frente a otros agentes dirigidos y quimioterapéuticos, se crecieron CSC CD44<sup>alto</sup> aisladas con FACS como esferas durante 72 horas antes de ser pulsadas con un panel de agentes terapéuticos. De los agentes ensayados, sólo 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  $CI_{50}$  para la muerte celular en ensayos similares. Se añadieron Tarceva, Sutent y Gleevec a aproximadamente tres veces sus concentraciones terapéuticas indicadas. Esto demuestra que aunque las células madre del cáncer son resistentes a agentes quimioterapéuticos y dirigidos convencionales, el compuesto 401 es altamente eficaz para inhibir su crecimiento.

**Identificación de compuestos que inhiben la esferogénesis de CSC *in vivo*.** Se obtuvieron ratones nu/nu atómicos hembra de seis semanas de edad en Charles River Labs (Wilmington, MA). A los ratones se les inyectaron por ruta subcutánea en el flanco  $6 \times 10^6$  células de cáncer FaDu o Paca2 en 0,2 mL de DMEM sin suero. Después de que los xenoinjertos alcanzasen un tamaño de  $\sim 200 \text{ mm}^3$ , se administró a los animales que portan los tumores del xenoinjerto Paca2 bien vehículo, gemcitabina (120 mg/kg, dos veces semanales) o el compuesto 401 (20 mg/kg) por ruta ip durante una semana, y se administró a los animales que portan los tumores del xenoinjerto FaDu diariamente bien vehículo, carboplatino (30 mg/kg) o el compuesto 401 (20 mg/kg) por ruta ip durante dos semanas antes del sacrificio. Después, los tumores 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  $0,1 \text{ mm}^3$  antes de ser digeridos en 1 mg/mL colagenasa/HBSS durante 15-30 minutos con agitación constante. Después de paso a través de un filtro de malla de  $40 \mu\text{m}$ , se retiraron los RBC, las células muertas y los restos celulares extendiendo la suspensión celular en capa sobre 1 mL de Histopaque y recogiendo la capa de interfase después de una centrifugación a  $1.440 \times g$  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 adherencia ultra baja a una densidad de 100 células por pocillo en medio de células madre del cáncer (DMEM/F12, suplemento Neurobasal B27, 20 ng/mL EGF, 10 ng/mL FGF, 4  $\mu\text{g/mL}$  insulina y 0,4% BSA). 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 tripán 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 esferogénesis incrementada. Por el contrario, los tratamientos con el compuesto 401 disminuyeron las células madre del cáncer, según se evidenció por una esferogénesis disminuida.

#### Ejemplo 4

##### Eficacia Anti-metástasis

El compuesto 401 también se ensayó para determinar su capacidad para inhibir la metástasis en un modelo ISMS. El sistema del modelo de ratón desnudo 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 desnudos. El bazo volvió a introducirse en la cavidad peritoneal y se cerró la incisión. Los ratones se sacrificaron cuando estaban moribundos ó 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 2 grupos, un grupo control al que se proporcionó vehículo ( $n = 4$ ) y el otro grupo, que recibió 20 mg/kg del compuesto 401 ( $n = 4$ ). El fármaco se administró por ruta ip. 5 días/semana, comenzando desde el día 2 al día 30 después de la inyección i.s. Se estimó el número de tumores primarios y tumores hepáticos metastásicos con un microscopio. En la figura 13 se muestran fotografías representativas. En el grupo control de vehículo, se aprecia una gran carga de tumores primarios en el bazo (Figura 13, panel superior izquierdo). También se observaron metástasis hepáticas espontáneas masivas (Figura 13, panel superior derecho). Los tratamientos con el compuesto 401 redujeron significativamente el número de focos de tumor primario y la metástasis hepática espontánea (Figura 13, paneles inferiores).

#### Ejemplo 5

##### Actividad Combinatoria

Se cultivaron células de cáncer pancreático humano Paca2, células de cáncer de pulmón humano A549, y células de cáncer de hígado humano HepG2 (American Type Culture Collection) en medio de Eagle modificado por Dulbecco que contenía 10% suero bovino fetal, 100 unidades/mL penicilina, 100  $\mu\text{g/mL}$  estreptomycin, y 2mM L-glutamina. El Compuesto 401 y Sutent fueron sintetizados por Boston Biomedical, Inc. El carboplatino, doxorubicina, docetaxel, etopósido se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO) y se disolvieron en agua o DMSO a 10 mM. El erlotinib fue de American Custom Chemicals (San Diego, CA). La gemcitabina fue de Eli Lilly (Indianapolis, IN) en una disolución madre acuosa 20 mM. El sorafenib se adquirió en LKT (St. Paul, MN). El lapatinib fue de LC Laboratories (Woburn, MA). A no ser que se indique otra cosa, todos los compuestos se solubilizaron en DMSO a 10 mM y se alicuotaron a  $-20^\circ\text{C}$ . Se sembraron células de cáncer pancreático Paca2 creciendo exponencialmente a 1.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejó que se adhirieran durante 24 horas. Se añadieron al medio concentraciones

5 crecientes de los fármacos individuales y aquellos en combinación durante otras 24 horas. Después de una exposición de 24 horas, el fármaco se retiró y se añadió medio fresco durante los siguientes 10-14 días, permitiendo la formación de colonias. Las células se fijaron y se tiñeron con GIEMSA (Gibco BRL). Las colonias de más de 50 células se puntuaron como supervivientes y el porcentaje de supervivencia celular se normalizó respecto a los controles no tratados. Los resultados son un promedio de experimentos en duplicado. Alternativamente, se realizaron ensayos MTT 72 horas después del tratamiento en células A549 y HepG2.

10 Nuestros datos demuestran que el compuesto 401 tiene efectos beneficiosos cuando se combina con todos los fármacos ensayados. Entre ellos, la combinación con inhibidores de tirosina quinasa (TKI) mostró los resultados más destacables. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 14, el compuesto 401 tiene un efecto sinérgico en combinación con sorafenib en células A549 de pulmón humano a las 72 horas. De manera similar, las Figuras 15 a 17 muestran que el compuesto 401 también tiene efectos sinérgicos en combinación con erlotinib, lapatinib, y sunitinib (Sutent®), respectivamente, en células A549 de pulmón humano a las 72 horas. El resto de los datos se resume en la Tabla 4 y demuestran que el compuesto 401 mostró efectos beneficiosos cuando se combinó con todos los fármacos ensayados.

15 Tabla 4

Compuesto 401 (% de Inhibición)	X (% de Inhibición)	Compuesto 401+X (% de Inhibición)	Fármaco combinado (X)	Función ejemplar
<b>Formación de colonias en 7 días células PACA2</b>				
32 [66nM]	-	-	-	
66 [133nM]	-	-	-	
32	43 [16µM]	80	Carboplatino	Agente alquilante del ADN, dañino para el ADN
32	89 [16 nM]	100	Doxorrubicina	Intercalante del ADN, antibiótico, dañino para el ADN
32	48 [0,33nM]	62	Docetaxel	Anti-mitótico
32	58 [660nM]	81	Etopósido	inhibidor de la topoisomerasa II, dañino para el ADN
32	27 [6,75µM]	74	Lapatinib	TKI
32	26 [16µM]	40	Erlotinib	TKI
32	52 [12µM]	73	Sunitinib	TKI
66	36 [33nM]	96	Gemcitabina	Anti-metabolito
66	66 [2µM]	100	Sorafenib	TKI
<b>MTT 72 horas células A549</b>				
35 [500nM]	43 [2,5µM]	88	Erlotinib	TKI
36 [250nM]	29 [12,5nM]	54	Doxorrubicina	Intercalante del ADN, antibiótico, dañino para el ADN
35 [500nM]	75 [2,5µM]	81	Sunitinib	TKI
35 [500nM]	40 [2,5µM]	74	Sorafenib	TKI
35 [500nM]	66 [2,5µM]	85	Lapatinib	TKI
<b>MTT 72 horas células HepG2</b>				
43 [250 nM]	23 [12,5nM]	72	Doxorrubicina	Intercalante del ADN, antibiótico, dañino para el ADN
43	51 [2,5µM]	68	Sorafenib	TKI
7 [125 nM]	34 [625nM]	42	Sorafenib	TKI

5 Además, ensayamos el efecto combinado del compuesto 401 con gemcitabina en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano. Brevemente, se inocularon ratones desnudos hembra atímicos (Ncr) subcutáneamente con  $8 \times 10^6$  células de cáncer pancreático humano PaCa-2 MIA, y se dejó que los tumores crecieran hasta aproximadamente  $150 \text{ mm}^3$  de tamaño. Los animales se aleatorizaron en cuatro grupos de seis animales por grupo, y se trataron con control de vehículo, compuesto 401 a  $100 \text{ mg/kg}$  en la formulación clínica (20% Gelucire) oralmente diariamente, gemcitabina (Gemzar<sup>®</sup>) a  $120 \text{ mg/kg}$  (en PBS) intraperitonealmente cada tres días, o ambos. Los ratones recibieron un total de dos tratamientos semanales, y se analizaron los volúmenes medios de los tumores.

10 Como se muestra en la figura 18, el tratamiento bien con el compuesto 401 ( $100 \text{ mg/kg}$ ) o gemcitabina ( $120 \text{ mg/kg}$ ) solo retardó el crecimiento tumoral en un grado similar durante el tratamiento. Los animales tratados con el compuesto 401 ( $100 \text{ mg/kg}$ ) en combinación con gemcitabina ( $120 \text{ mg/kg}$ ) mostraron un efecto sinérgico en el crecimiento tumoral. No se observó una toxicidad significativa para ninguno de los regímenes de tratamiento. Nuestros datos sugieren que el compuesto 401 en combinación con gemcitabina es clínicamente beneficioso para tratar cáncer pancreático.

## 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. 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.
4. 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.
- 10 5. Dean, M., T. Fojo, y S. Bates, *Tumour stem cells and drug resistance*. Nat. Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 275-84.
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.
- 15 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.
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.
- 20 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.
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., *ABCBS-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma*. Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 4320-33.
- 25 13. Schatton, T., et al., *Identification of cells initiating human melanomas*. Nature, 2008. **451**(7176): p. 345-9.
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.
- 30 16. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
17. Collins, A.T., et al., *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10946-51.
18. Li, C., et al., *Identification of pancreatic cancer stem cells*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1030-7.
- 35 19. Ma, S., et al., *Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2542-56.
20. 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.
- 40 21. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 111-5.
22. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
23. Dalerba, P., et al., *Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells*. Proc Natl Acad Sci USA., 2007. **104**(24): p. 10158-63.
- 45 24. Klein, W.M., et al., *Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma*. Mod Pathol, 2007. **20**(1): p. 102-7.

25. Yu, H. *Stat3: Linking oncogenesis with tumor immune evasion*, en *AACR 2008 Annual Meeting*. 2008, San Diego, CA.
26. Pedranzini, L., A. Leitch, y J. Bromberg, *Stat3 is required for the development of skin cancer*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(5): p. 619-22.
- 5 27. 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.
28. Bromberg, J.F., et al., *Stat3 as an oncogene*. *Cell*, 1999. **98**(3): p. 295-303.
29. 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.
- 10 30. Schlette, E. J., et al., *Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(9): p. 1682-8.
31. Niu, G., et al., *Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis*. *Oncogene*, 2002. **21**(13): p. 2000-8.
- 15 32. Xie, T.X., et al., *Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis*. *Oncogene*, 2004. **23**(20): p. 3550-60.
33. Kortylewski, M., et al., *Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity*. *Nat Med*, 2005, **11**(12): p. 1314-21.
34. Burdelya, L., et al., *Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects*. *J Immunol*, 2005. **174**(7): p. 3925-31.
- 20 35. 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.
36. Darnell, J.E., *Validating Stat3 in cancer therapy*. *Nat Med*, 2005. **11**(6): p. 595-6.
37. 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.
- 25 38. 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.
39. Harris, T.J., et al., *Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity*. *J Immunol*, 2007. **179**(7): p. 4313-7.
- 30 40. 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.
41. Song, J.I. y J.R. Grandis, *STAT signaling in head and neck cancer*. *Oncogene*, 2000. **19**(21): p. 2489-95.
42. 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.
- 35 43. 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.
44. 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.
45. 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.
- 40 46. 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.
47. 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.
- 45 48. 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.
49. Chen, C.L., et al., *Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers*. *Br J Cancer*, 2007. **96**(4): p.

- 591-9.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. Migone, T.S., et al., *Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I*. Science, 1995. **269**(5220): p. 79-81.
55. Spiekermann, K., et al., *Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia*. Eur J Haematol, 2001. **67**(2): p. 63-71.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. Fu, X.Y., *STAT3 in immune responses and inflammatory bowel diseases*. Cell Res, 2006. **16**(2): p. 214-9.
61. Feldmann, M., F.M. Brennan, y R.N. Maini, *Role of cytokines in rheumatoid arthritis*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 397-440.
62. Krause, A., et al., *Rheumatoid arthritis synoviocyte survival is dependent on Stat3*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6610-6.
63. Pfitzner, E., et al., *The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(23): p. 2839-50.
64. 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.
65. 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.
66. Ivashkiv, L.B. e I. Tassiulas, *Can SOCS make arthritis better?* J Clin Invest, 2003. **111**(6): p. 795-7.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. Hagler, M., Smith-Norowitz, T., Chice, S., Wallner, S., Viterbo, D., Mueller, C., Groos, R., Nowakowski, M., Schulze, R., Zenilman, M., *Sphingolipids 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**(S1): p. S263-S263.
72. Benkhart, E.M., et al., *Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression*. J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1612-7.

73. 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.
74. 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.
- 5 75. 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.
76. Tefferi, A., *Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 240-5.
- 10 77. Roder, S., et al., *STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera*. Exp Hematol, 2001. **29**(6): p. 694-702.
78. 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.
- 15 79. Wyss-Coray, T., *Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?* Nat Med, 2006. **12**(9): p. 1005-15.
80. 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.
81. 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.
- 20 82. 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.

**Listado de secuencias**

- <110> Boston Biomedical, Inc.
- 5 <120> NUEVAS COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER  
 <130> P43924
- 10 <140> EP 08830633.7  
 <141> 10-09-2008
- <150> US 60/971.144  
 <151> 10-09-2007
- 15 <150> US 61/013.372  
 <151> 13-12-2007
- <160> 5
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial
- <220>  
 <223> Oligonucleótido
- 30 <400> 1
- gatccttctg ggaattccta gatc** 24
- <210> 2  
 35 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- <220>  
 40 <223> Cebador oligonucleotídico Stat3 TPIV Dir
- <400> 2
- ggatctagaa tcagctacag cagc** 24
- 45 <210> 3  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 50 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico Stat3 TPIV Inv
- <400> 3
- 55 **tcctctagag ggcaatctcc attg** 24
- <210> 4  
 60 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- <220>  
 65 <223> Cebador oligonucleotídico GL2 TPIV Dir

<400> 4

ccctctagat ggttcctgga ac

22

5 <210> 5  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Cebador oligonucleotídico GL2 TPIV Inv

<400> 5

15 gctctagaaa cccctttttg g

21

**REIVINDICACIONES**

1. Una combinación que comprende un primer agente para inhibir la actividad aberrante de la ruta de Stat3 y un segundo agente para su uso en el tratamiento de un sujeto con un cáncer que está asociado con la actividad aberrante de la ruta de Stat3, en el que el primer agente se selecciona 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-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste; y el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel, erlotinib, sunitinib, lapatinib, sorafenib, carboplatino, doxorubicina, docetaxel, gemcitabina y etopósido.
- 5
2. La combinación de 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, carcinoma de células renales, melanoma, carcinoma hepatocelular, cáncer cervical, sarcoma, tumor cerebral, cáncer gástrico, mieloma múltiple, leucemia, y linfoma.
- 10
3. La combinación de la reivindicación 1, en la que el primer agente es 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de éste.
- 15
4. La combinación de la reivindicación 1 o reivindicación 3 en la que el cáncer es metastásico, refractario a un tratamiento de cáncer de primera línea estándar, o recidivante.
5. La combinación de la reivindicación 1, en la que el primer agente es 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona y el segundo agente es gemcitabina, en la que el primer agente se formula en una composición que comprende Gelucire®.
- 20

Figura 1

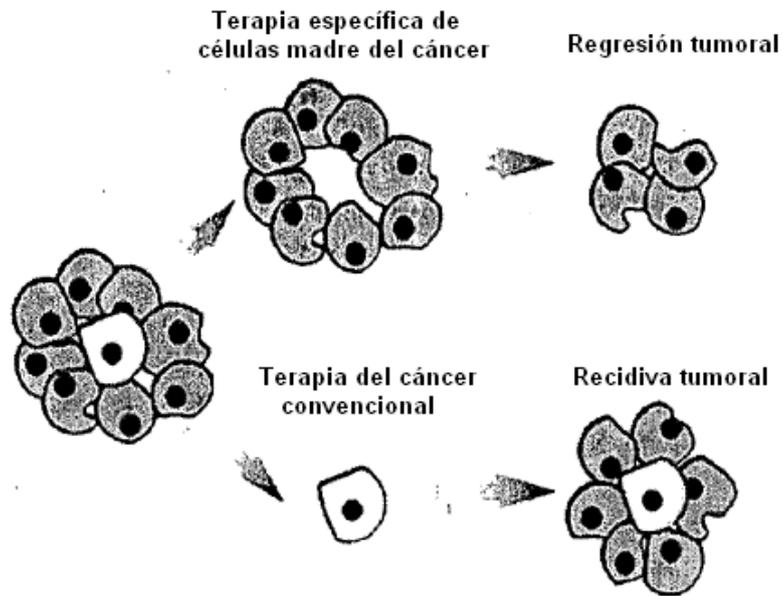


Figura 2

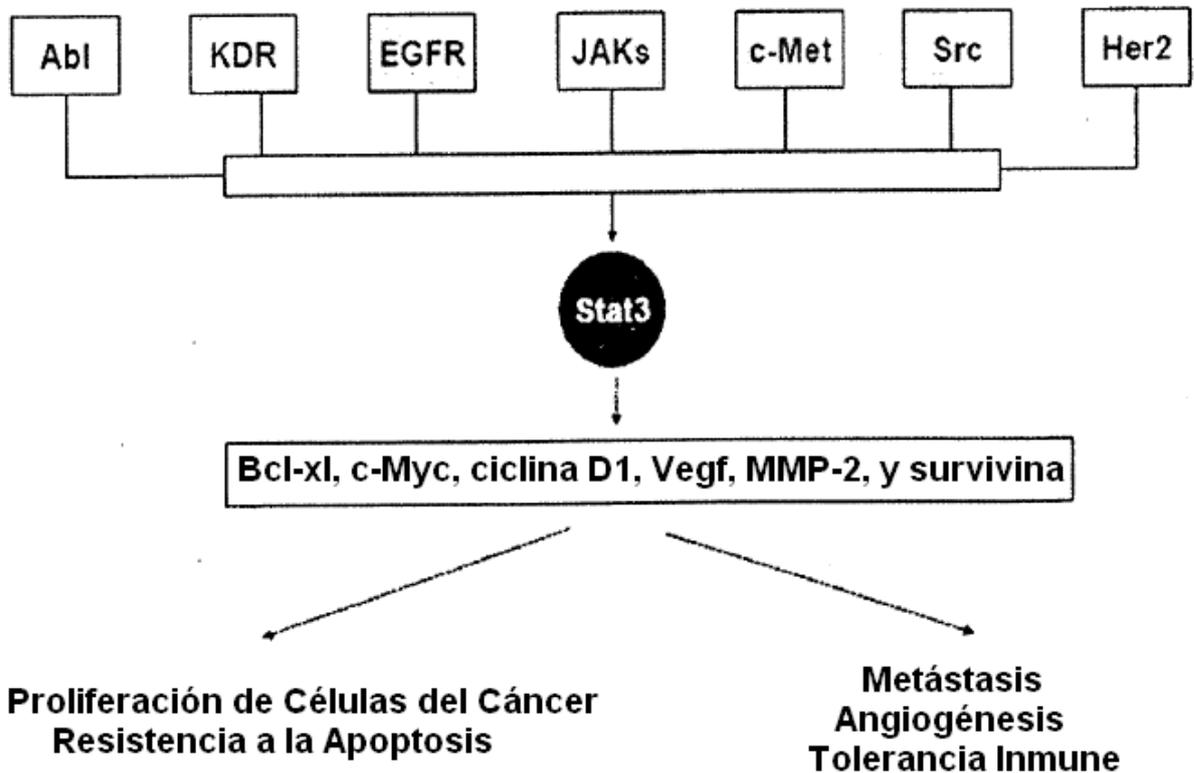


Figura 3A

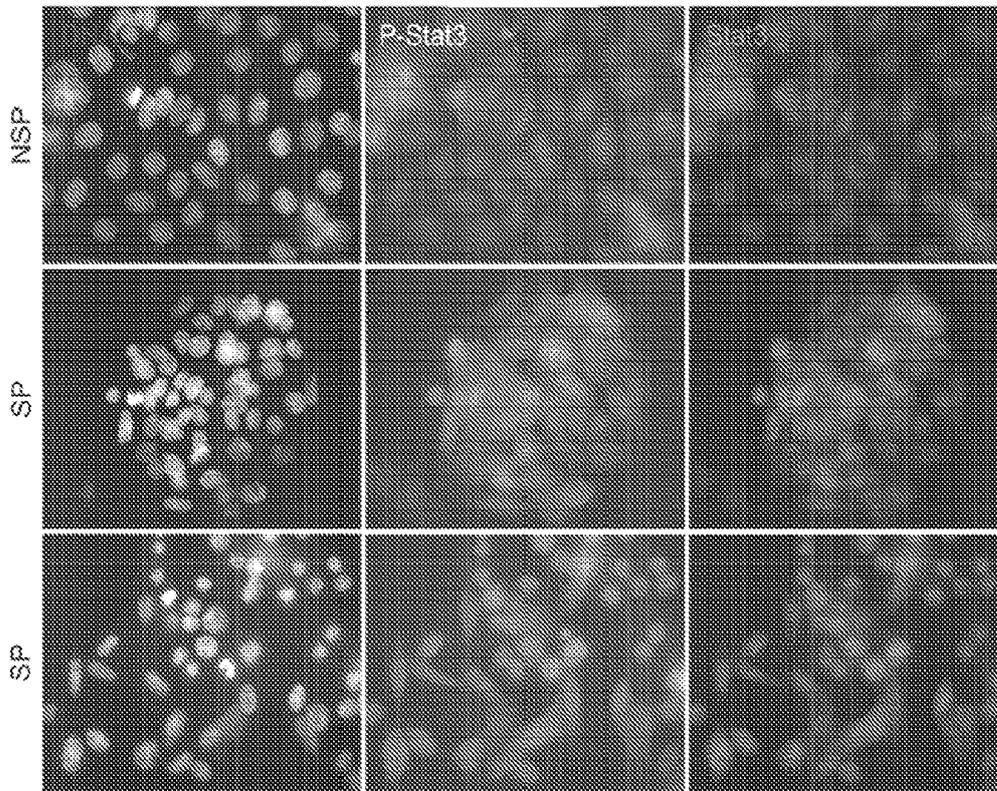


Figura 3B

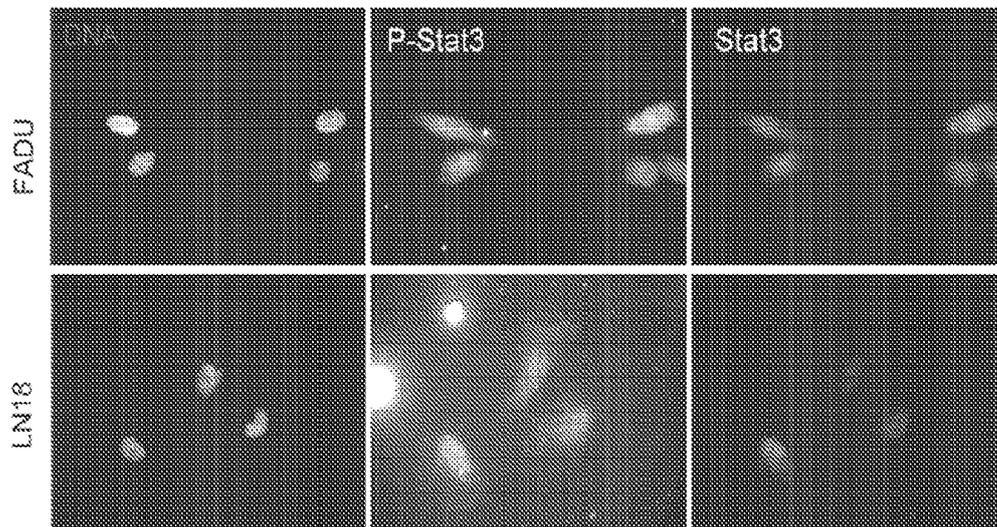


Figura 4A

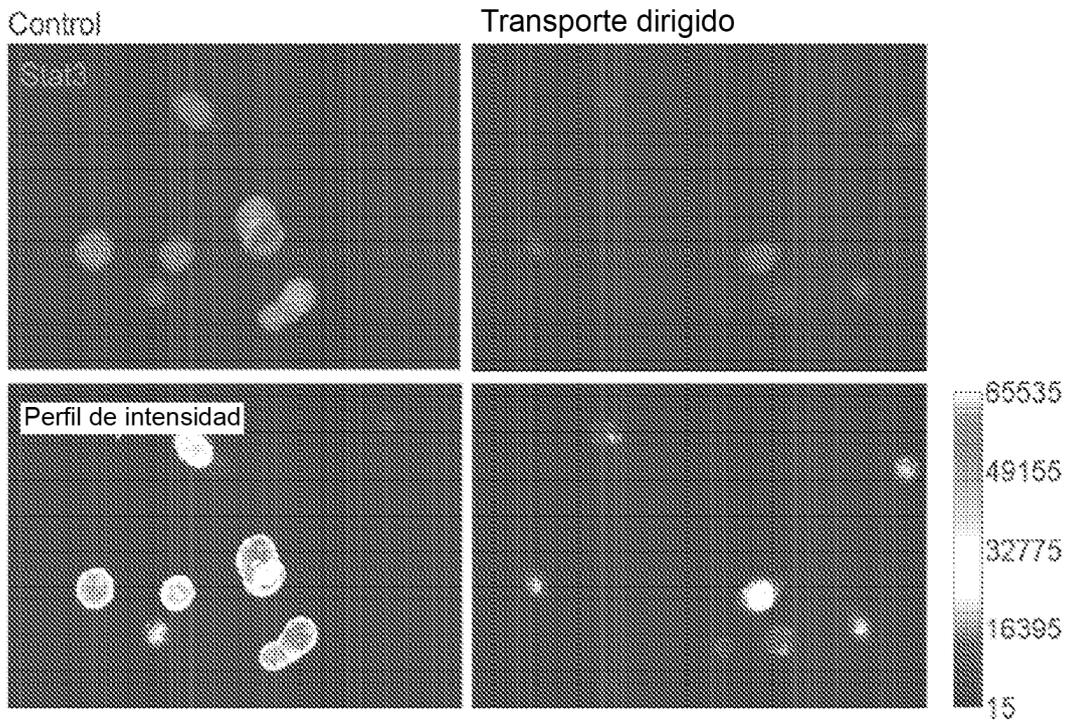


Figura 4B

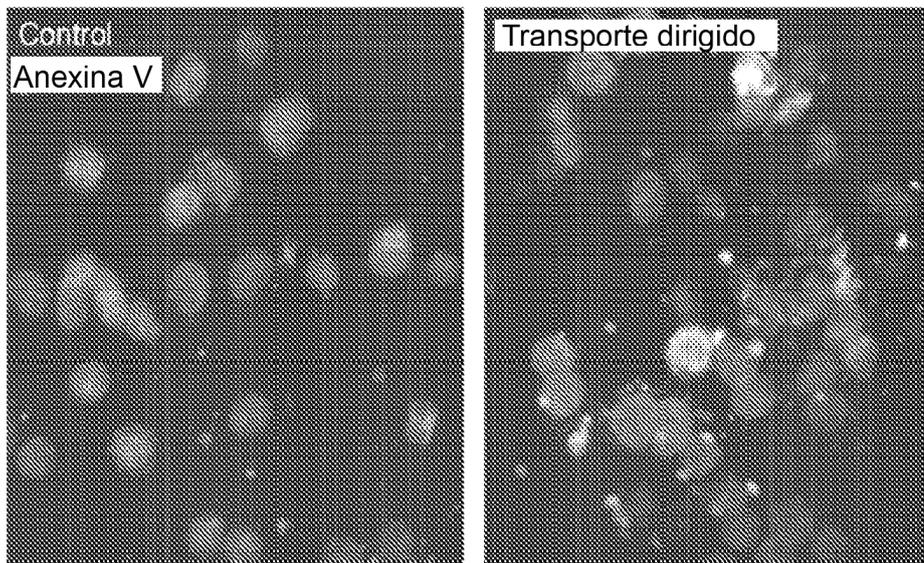


Figura 5

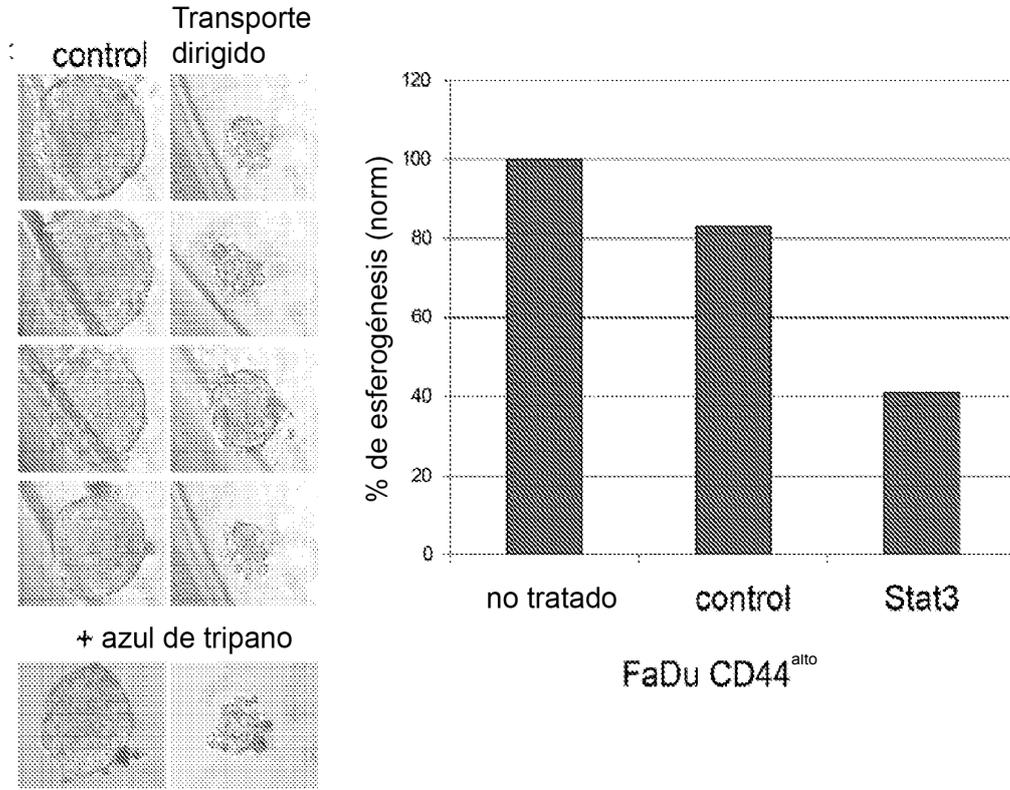


Figura 6

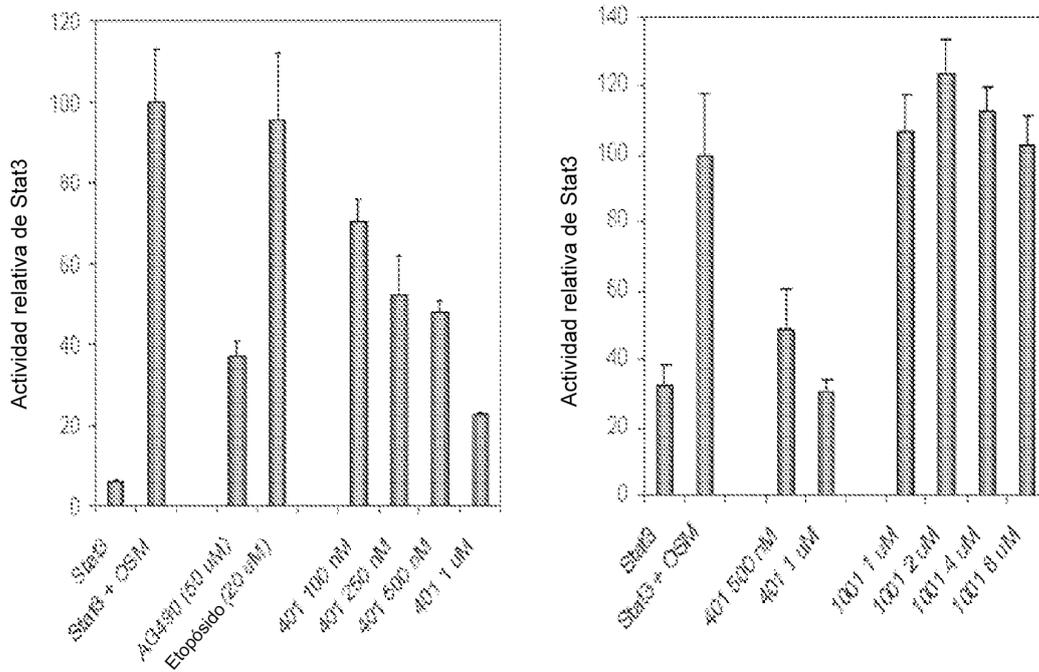


Figura 7A

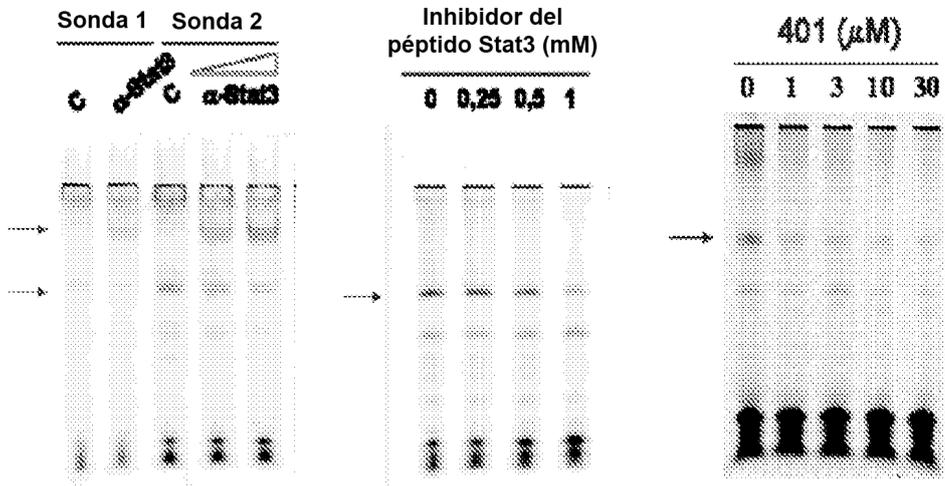


Figura 7B

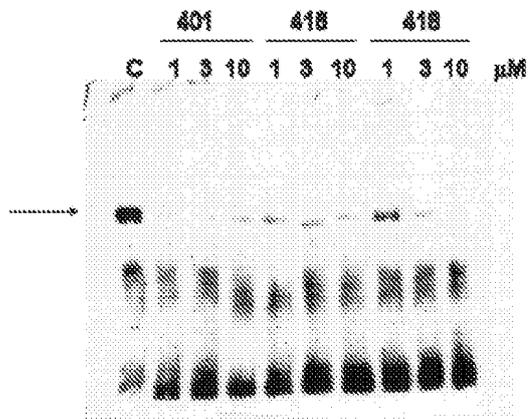


Figura 8

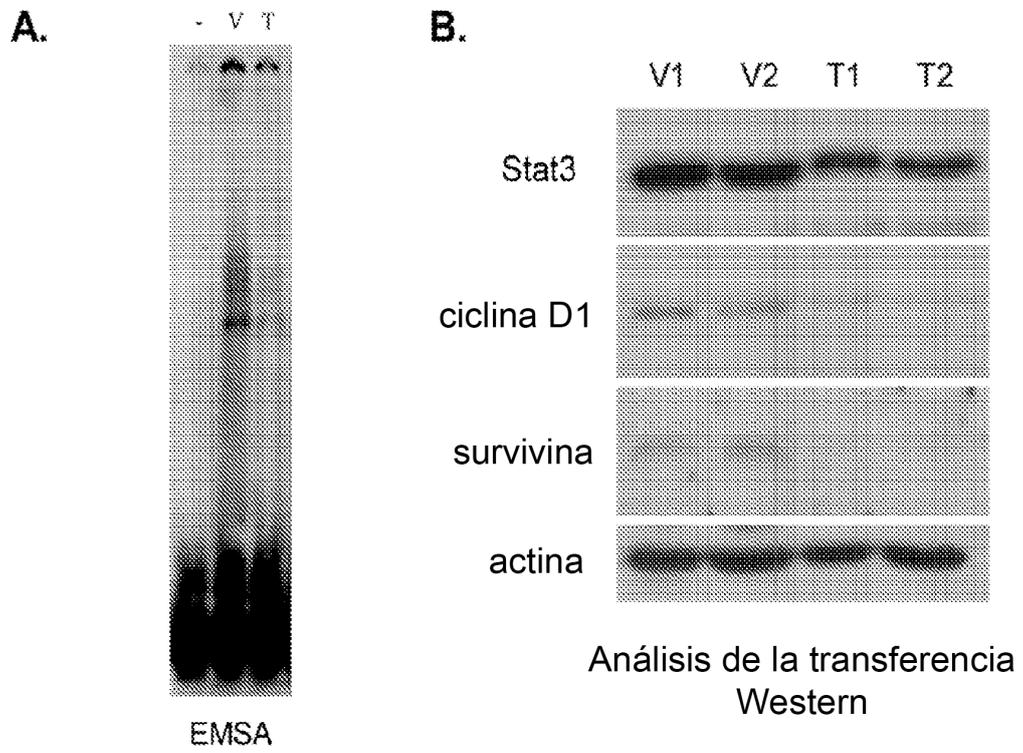
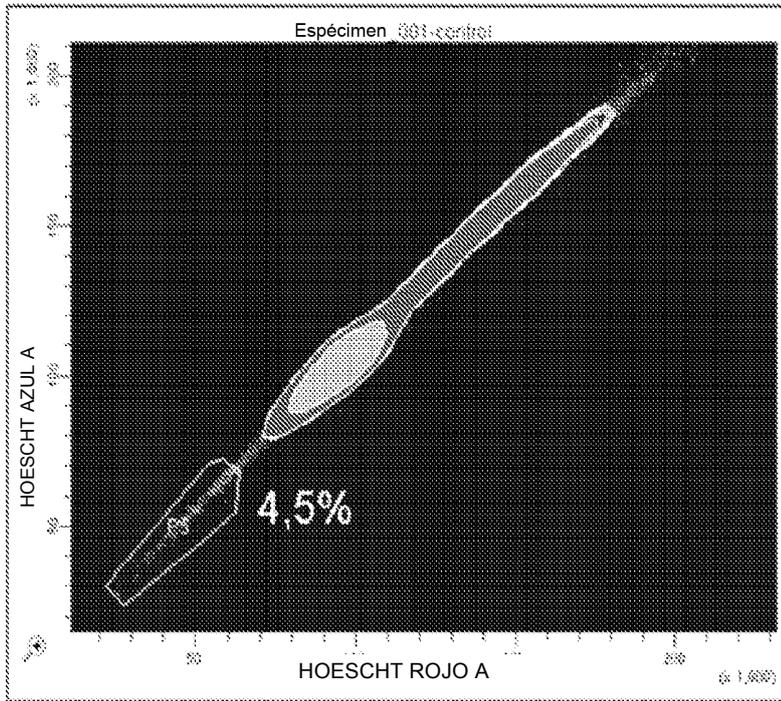
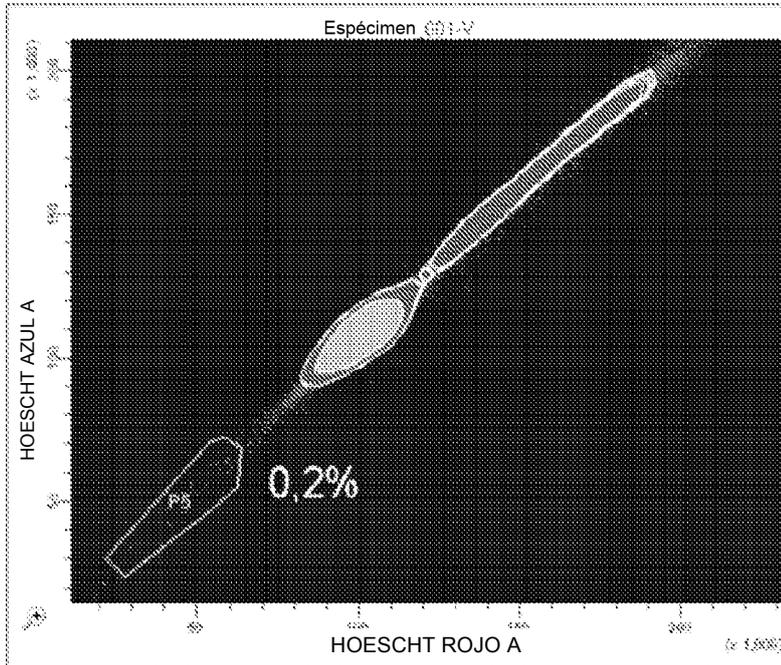


Figura 9A



(-) Verapamilo



(+) Verapamilo

Figura 9B

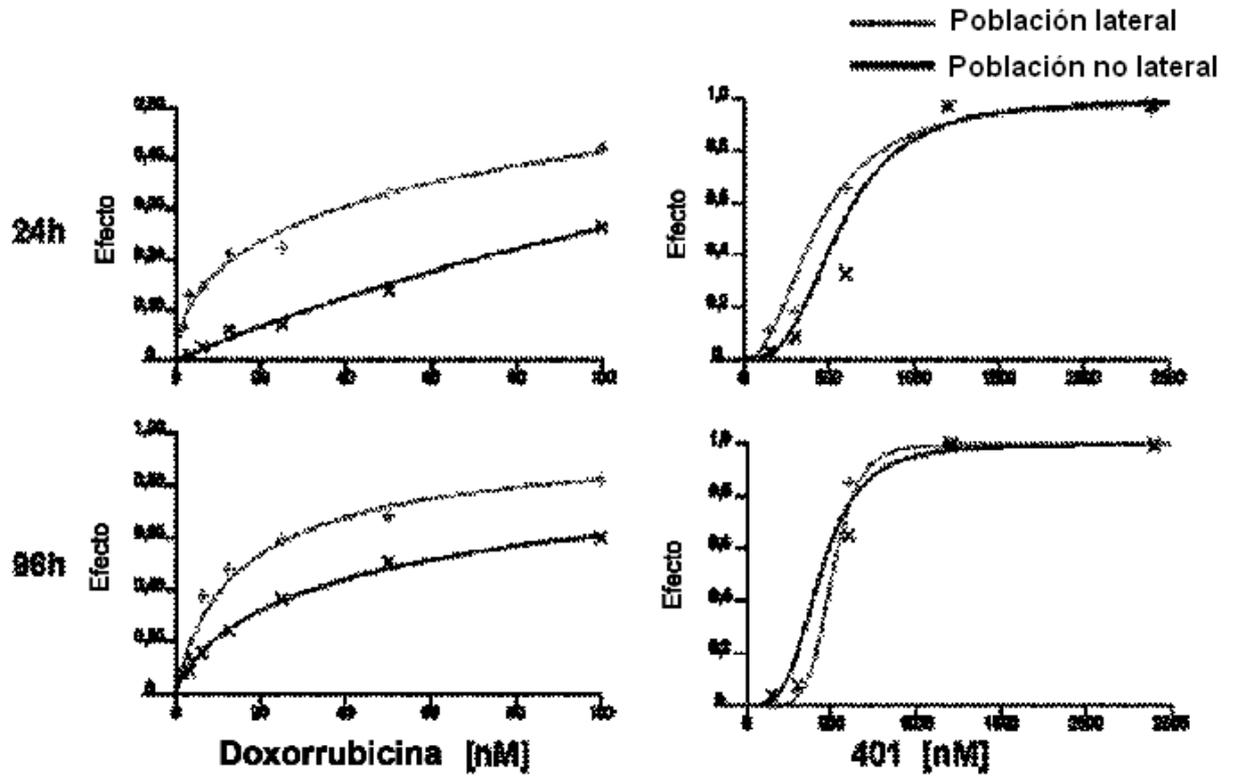


Figura 10A

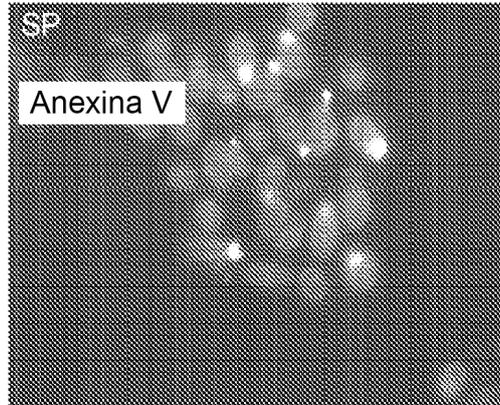


Figura 10B

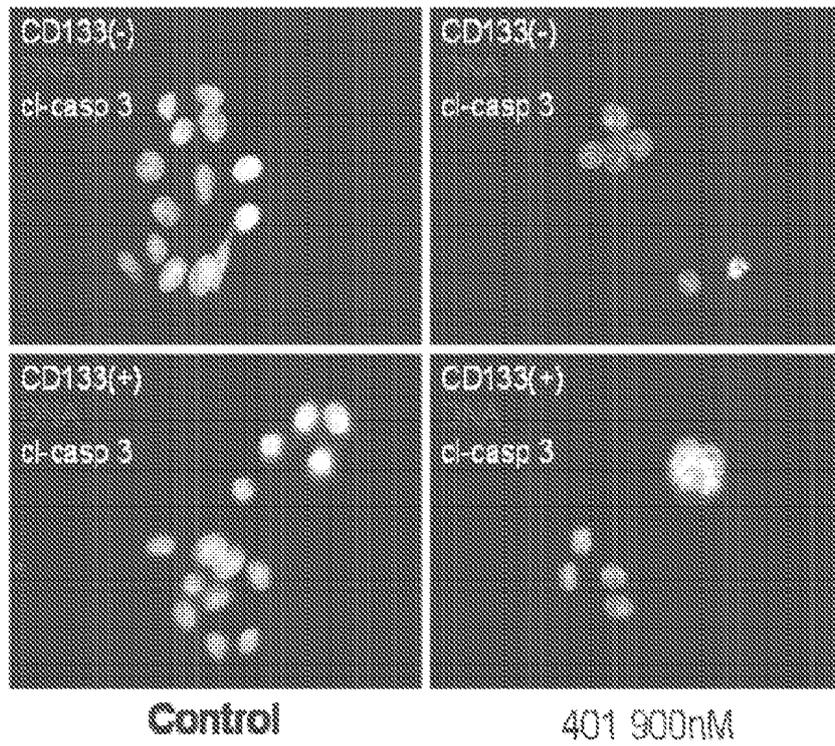


Figura 11

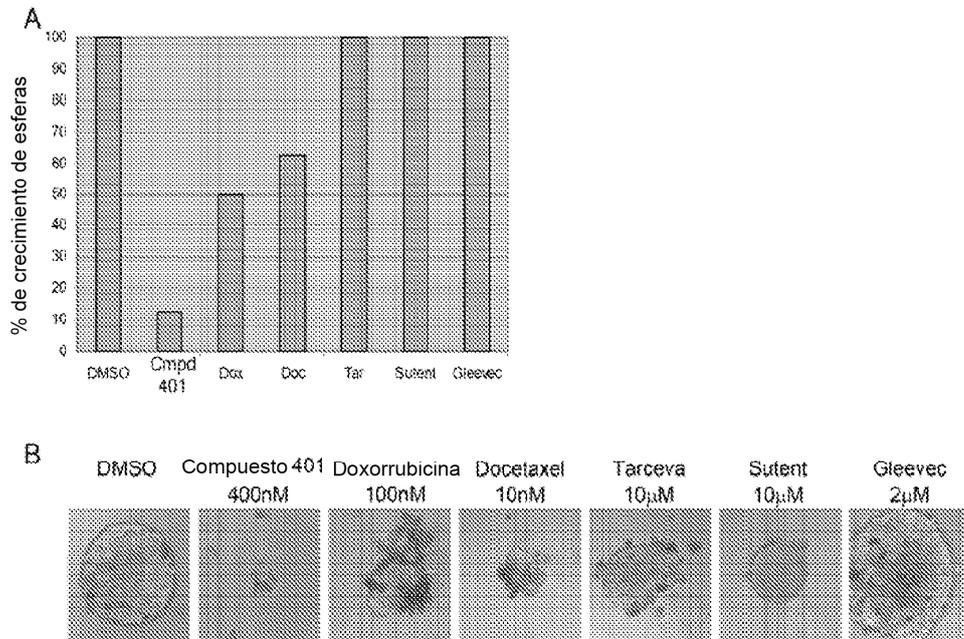


Figura 12

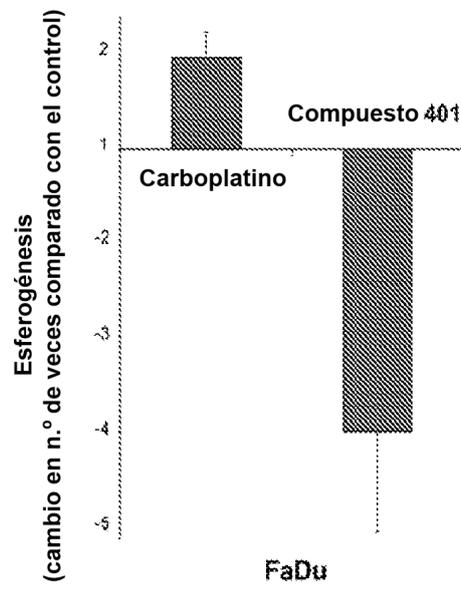
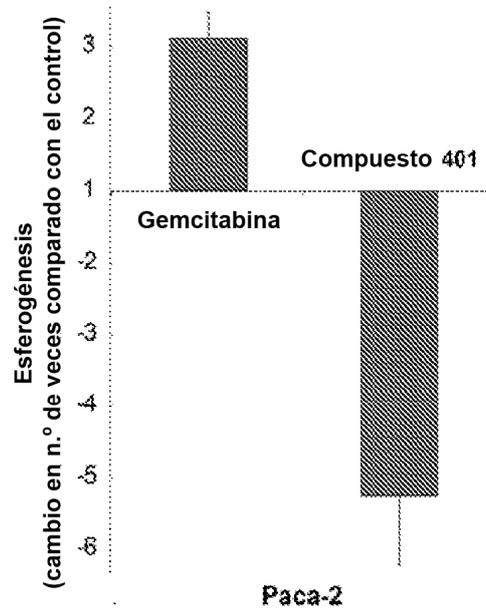
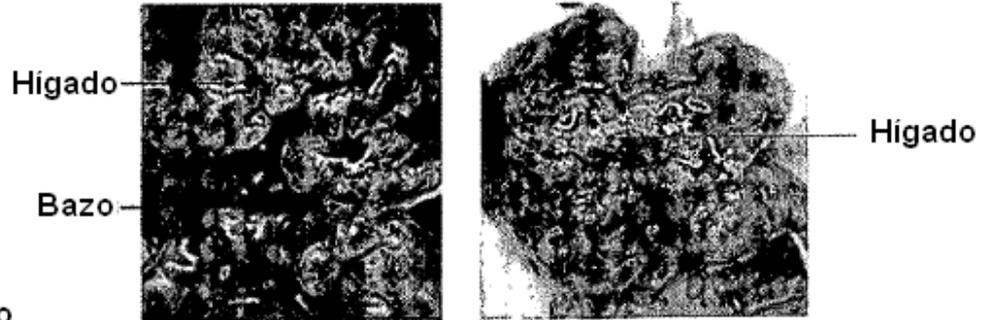


Figura 13

**Control en el día 30**



Representativo  
de fotografías  
*in situ*:

**401 en el día 30**



Figura 14

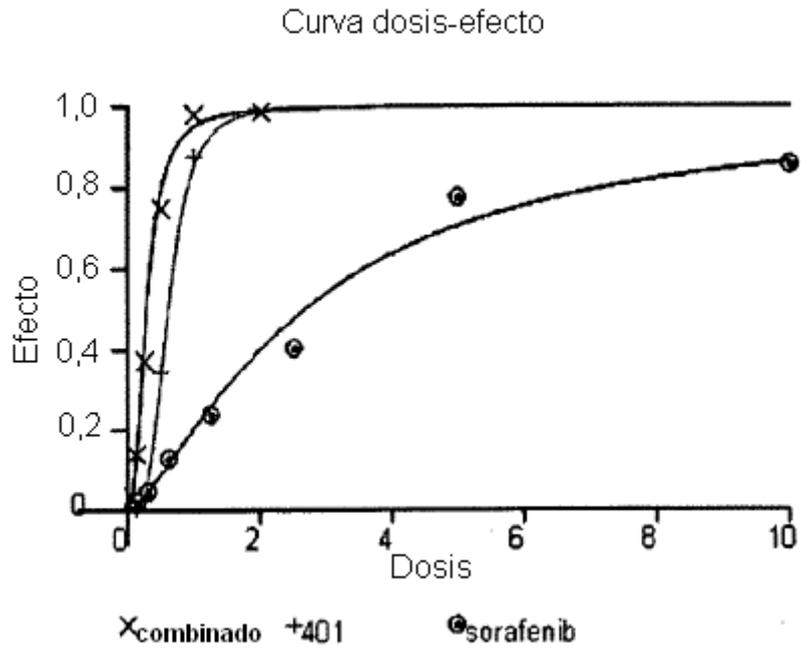


Figura 15

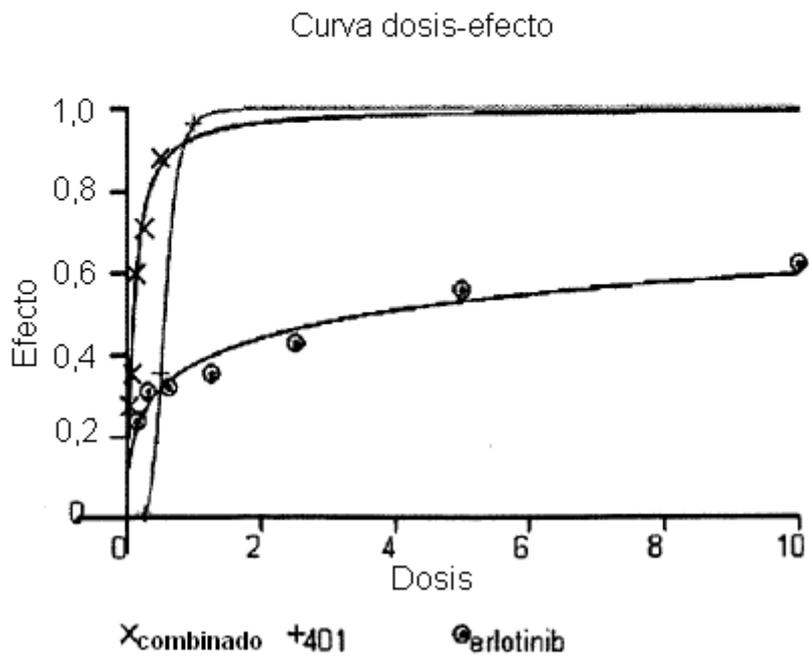


Figura 16

Curva dosis-efecto

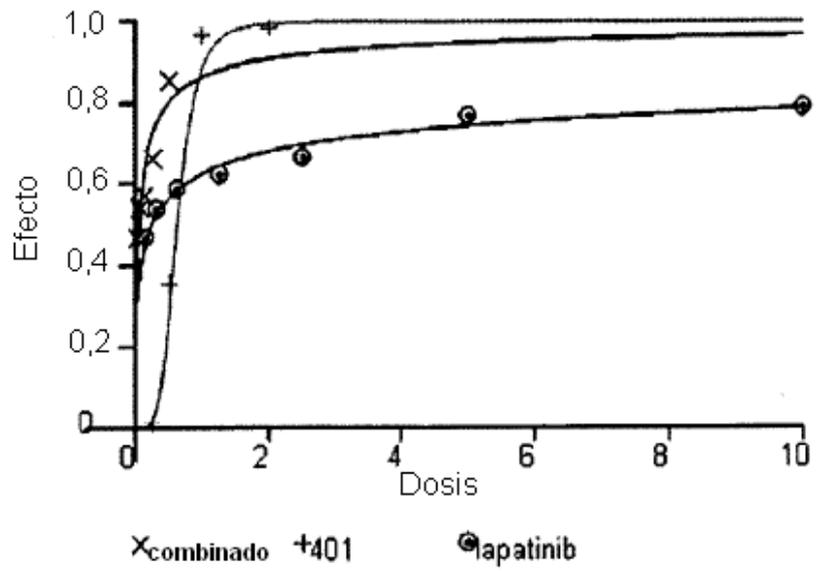


Figura 17

Curva dosis-efecto

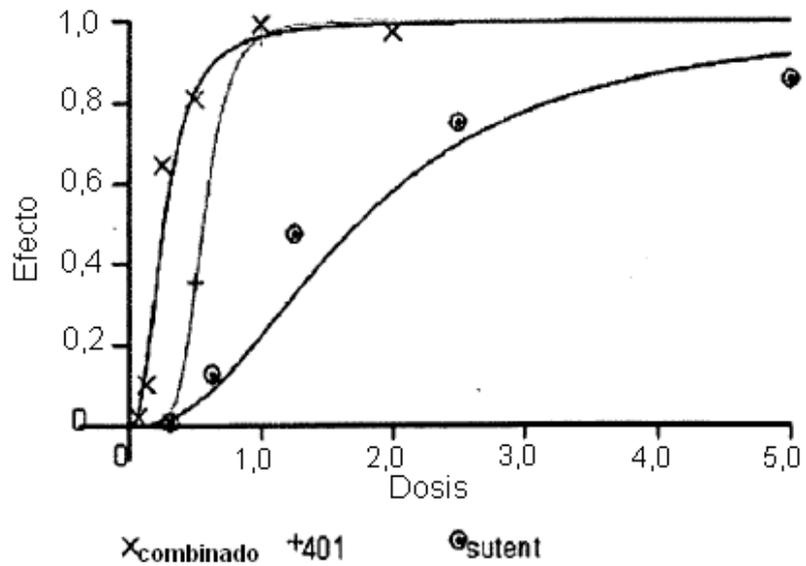


Figura 18

