

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 921**

51 Int. Cl.:

A61K 31/216 (2006.01)
A61K 31/22 (2006.01)
A61K 31/23 (2006.01)
A61K 31/231 (2006.01)
C07C 69/618 (2006.01)
C07C 69/74 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2013 PCT/BR2013/000455**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14066967**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2013 E 13850517 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2915800**

54 Título: **Compuestos derivados de ingenol que pueden usarse para tratar cáncer**

30 Prioridad:

01.11.2012 BR 102012028120

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2018

73 Titular/es:

**AMAZONIA FITOMEDICAMENTOS LTDA (100.0%)
Rua Francisco Leandro nº 399B sala 01
CEP 60844-150-Fortaleza-CE, BR**

72 Inventor/es:

**PIANOWSKI, LUIZ FRANCISCO y
TELLES, EVERARDO FERREIRA**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 668 921 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).

COMPUESTOS DERIVADOS DE INGENOL QUE PUEDEN USARSE PARA TRATAR CÁNCER**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a nuevos compuestos derivados de ingenol útiles para tratar cáncer. En otros aspectos, la invención se refiere a una composición farmacéutica, un medicamento, para su uso en un método para tratar cáncer y a una forma de dosificación.

10

Antecedentes de la invención

Cáncer es el nombre dado a un grupo de más de 100 enfermedades que tienen, en común, el crecimiento desorganizado de células que invaden tejidos y órganos, y que pueden diseminarse a otras regiones del cuerpo, en lo que se denomina metástasis.

15

Los diferentes tipos de cáncer se corresponden con diversos tipos de células del cuerpo. Por ejemplo, hay varios tipos de cánceres de piel, dado que la piel comprende más de un tipo de célula. Si el cáncer comienza en tejidos epiteliales, tales como la piel o la mucosa, se denomina carcinoma. Si comienza en tejidos conjuntivos, tales como huesos, músculos o cartílago, se denomina sarcoma. Otras características que diferencian un tipo de cáncer de otros son la velocidad de multiplicación celular y su capacidad para invadir tejidos y órganos, en las proximidades o lejos de su origen.

20

La dificultad para el tratamiento eficaz de cáncer se relaciona con el establecimiento de la distinción entre células malignas y normales del cuerpo. Ambas se derivan de la misma fuente y son muy similares, y por este motivo, no hay un reconocimiento significativo por parte del sistema inmunitario en cuanto a la amenaza. Hasta ahora, el cáncer puede tratarse mediante cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia (terapia con anticuerpos monoclonales). La elección del tratamiento depende de la ubicación, el grado tumoral y el estadio de la enfermedad, así como el estado general del paciente. La extirpación completa del tumor sin dañar el resto del organismo es el objetivo principal del tratamiento. A veces, esto puede lograrse mediante cirugía, pero la propensión de la enfermedad a invadir tejidos adyacentes o a diseminarse a sitios distantes (metástasis) a menudo limita su eficacia. La eficacia de la quimioterapia está, en la mayoría de los casos, limitada por su toxicidad para otros tejidos (células) del organismo, así como la radioterapia, que también puede dañar tejidos normales. En la inmunoterapia, las células cancerígenas desarrollaron mecanismos para escapar de la respuesta inmunitaria, un fenómeno conocido como resistencia al tratamiento. El documento US 2009/0142421 da a conocer derivados de ingenol para su uso en el tratamiento de cáncer.

25

30

35

Descripción de las figuras

Las figuras descritas a continuación se refieren a valores de CI_{50} obtenidos exponiendo líneas tumorales humanas a los compuestos de la invención.

40

Figura 1 – Líneas HB4A, MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT20, HT587T, MCF7 y MCF7/AZ, relacionadas con cáncer de mama.

45

Figura 2 - Líneas SW480, SW620, CO115, HCT15, HT29, SK-CO-10, DLD1, LOVO, DIFI y Caco2, relacionadas con cáncer colorrectal.

Figura 3 - Líneas JHU28, JHU13, JHU12, HN13, SCC25, SCC4, SCC14 y FADU, relacionadas con cáncer de cabeza y cuello.

50

Figura 4 - Líneas H292 y A549, relacionadas con cáncer de pulmón; líneas GRM, COLO858, COLO679, A375, WN1617, WN9, WMM852, WN793 y SKMEL37, relacionadas con melanoma; línea A431m, relacionada con carcinoma epidermoide; y líneas DAOY y ONS76, relacionadas con meduloblastoma.

55

Figura 5 - Líneas PC-3 LNCaP y PNT2, relacionadas con cáncer de próstata; líneas T24, 5637, HT1376 y MCR, relacionadas con cáncer de vejiga; línea JEG3, relacionada con coriocarcinoma; líneas SIHA, CASKI, C33 y HELA, relacionadas con cáncer de cuello uterino.

Figura 6 - Líneas KYSE30, KYSE70, KYSE279 y KYSE410, relacionadas con cáncer esofágico; líneas MiaPaCa-2, PANC1, PSN-1 y BXPC-3, relacionadas con cáncer pancreático.

60

Figura 7 - Líneas U87-MG, U373, U251, GAMG, SW1088, SW1783, NHA, SNB19, RES186, RES259, KNS42, UW479 y SF188, relacionadas con gliomas.

65

Figura 8 – Línea Jurkat, de leucemia, y líneas PA-1 y SW626, relacionadas con cáncer de ovario.

Figura 9 – algunas líneas de células cancerosas, comparadas con el valor obtenido con el compuesto temozolomida (indicado como TMZ), un fármaco usado en el tratamiento de cáncer de cerebro.

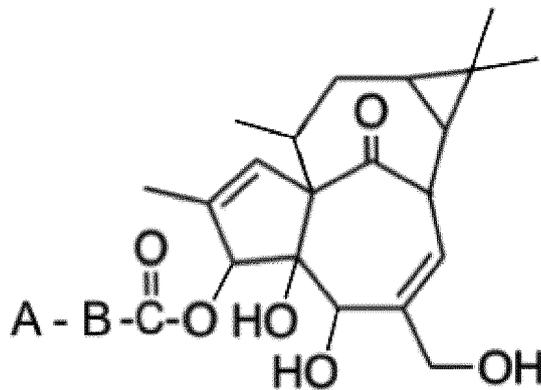
5 **Descripción detallada de la invención**

La búsqueda de nuevas formas para tratar cáncer es un proceso en constante progreso, y dentro de esta dinámica, se desarrollaron nuevos principios activos que eran útiles en el tratamiento de cáncer, combinados con baja toxicidad.

10

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a compuestos derivados de ingenol, de fórmula I

FÓRMULA I



15

donde

A es fenilo, CH₃- o CH₂=CH-,

20

y B es -CH=CH-, [-CH₂]_x o [-CH₂]_y,

en el que x es un número entero que oscila entre 1 y 10, preferiblemente entre 2 y 6, e y es un número entero que oscila entre 1 y 10, preferiblemente entre 8 y 10,

25

siempre que:

cuando A es fenilo, B es -CH=CH-;

cuando A es CH₃-, B es [-CH₂]_x;

30

cuando A es CH₂=CH-, B es [-CH₂]_y

para tratar cáncer.

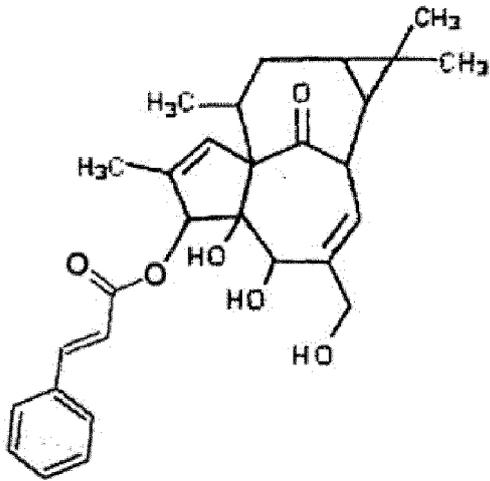
35

Particularmente, los compuestos derivados de ingenol de la invención son adecuados para el tratamiento de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro (por ejemplo, glioma y meduloblastoma), cáncer de próstata, cáncer de vejiga, coriocarcinoma, cáncer de cuello uterino, leucemia, cáncer de piel (por ejemplo, carcinoma epidermoide y melanoma), cáncer esofágico, cáncer pancreático y cáncer de ovario.

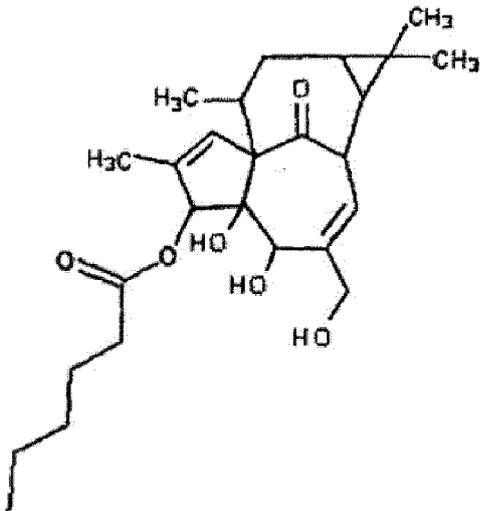
40

Ejemplos particulares de derivados de ingenol adecuados para la invención, son:

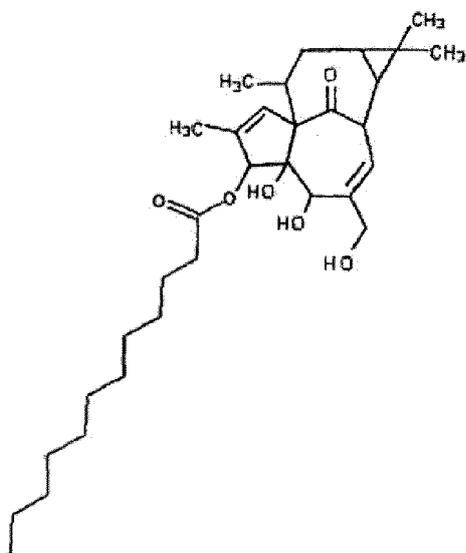
3-cinnamil-ingenol



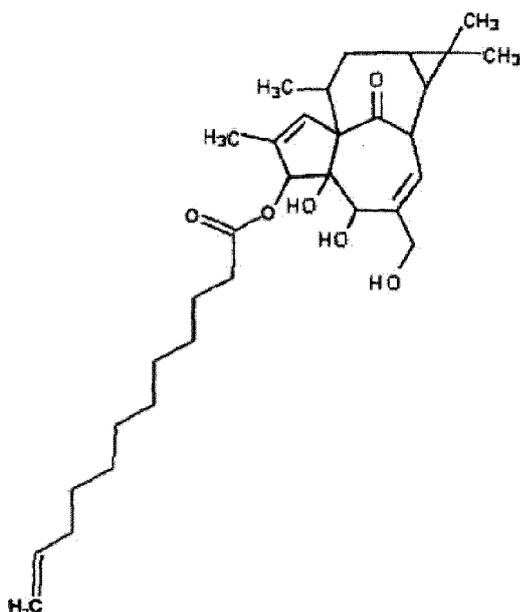
3-hexanoil-ingenol



3-dodecanoil-ingenol



3-dodeca-11-enoil-ingenol



La fórmula I abarca sus sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente.

5

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I están dentro de los derivados farmacéuticamente activos. Un contraíón particular, que es parte de cualquier sal de un compuesto de la invención, no presenta normalmente una naturaleza crítica, siempre que la sal en su totalidad sea farmacológicamente aceptable y siempre que el contraíón no contribuya a cualidades no deseadas de la sal en su totalidad.

10

Sin excluir ninguna otra, pueden citarse sales de adición de ácido como sales farmacéuticamente aceptables, tales como sales inorgánicas, por ejemplo, ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico y fosfórico, o sales orgánicas, por ejemplo, de ácidos acético, propiónico, hexanoico, heptanoico, glicólico, pirúvico, láctico, malónico, succínico, málico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, cinnámico, metanosulfónico, p-clorobenzenosulfónico, 2-naftalensulfónico, p-toluenosulfónico, canforsulfónico, trimetilacético, t-butil-acético, lauril-sulfúrico, glucónico, glutárico, hidroxinaftoico, salicílico, esteárico, mucónico, mandélico y 2-hidroxi-etanosulfónico. Pueden citarse sales de adición básicas como sales farmacéuticamente aceptables, tales como sales de amonio, sales de metales alcalinos, tales como sodio, potasio, litio, calcio o magnesio, sales con bases orgánicas, tales como sales de aminas primarias, secundarias o terciarias (por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, triisopropilamina, tri-n-propilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, trometamina, dicitohexilamina, N-metil-D-glucamina y sales con aminoácidos, como arginina, lisina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, teobromina, purina, morfolina. En algunas realizaciones posibles, los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden cuaternizarse con agentes de tipo haluro de alquilo, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo o butilo; haluros de cadena larga, tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo.

15

20

25

En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de fórmula I, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Pueden citarse las siguientes publicaciones como fuentes de información sobre tales excipientes: "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición o posterior, editorial Lippincott, Williams & Wilkins; "Pharmaceutical Dosage Forms And Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel *et al.*, 7ª edición, editorial Lippincott, Williams & Wilkins; "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (2000) A. H. Kibbe *et al.*, 3ª edición, editorial American Pharmaceutical Association.

30

Los derivados de ingenol de la invención, y las composiciones que los contienen pueden administrarse a un paciente humano o animal (no humano) mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, vía oral, parenteral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, transdérmica, sublingual, rectal, intramuscular, transbucal, intranasal, liposomal, mediante inhalación, vaginal, subcutánea, intraadiposa, intraocular, intraarticular o intratecal, usando un catéter o endoprótesis.

35

No hay restricciones particulares con respecto a las formas de dosificación que contienen los compuestos derivados de ingenol de la invención. Por ejemplo, pueden usarse comprimidos, pastillas para chupar, cápsulas, gránulos, grageas y similares para administración oral sólida. Para la administración oral líquida, pueden usarse disoluciones, dispersiones, suspensiones, emulsiones, aceites. Otras formas de dosificación adecuadas son liposomas y nanopartículas, o cualquier otra forma conocida para un experto en la técnica. La forma de dosificación puede ser de liberación inmediata, sostenida o controlada.

40

45

En un aspecto particular, la composición de la invención comprende, además de uno o más compuestos derivados de ingenol de fórmula I, al menos un principio activo adicional diferente del mismo, por ejemplo, elegido de entre un agente antitumoral, antibiótico, agente anticaquexia, agente neurológico, agente antidiabético, agente antihipertensor, inhibidores de la bomba de protones.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un medicamento que comprende uno o más compuestos derivados de ingenol de fórmula I.

10 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de uno o más compuestos derivados de ingenol de fórmula I en la preparación de un producto útil para el tratamiento de cáncer.

En aún otro aspecto particular, la invención se refiere a uno o más compuestos derivados de ingenol de fórmula I para tratar cáncer.

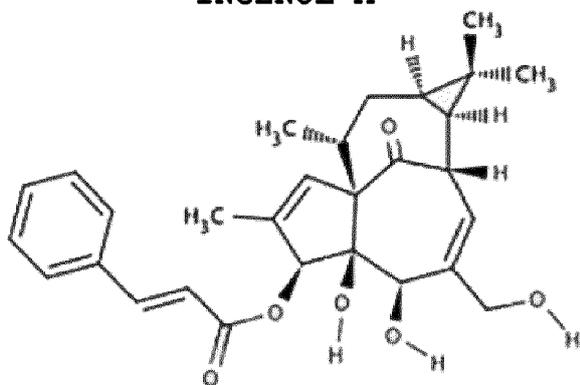
15 En aún otro aspecto particular, la invención se refiere a una forma de dosificación para tratar cáncer, caracterizada por contener entre 0,01 y 5000 mg de uno o más derivados de ingenol de fórmula I, según la reivindicación 1. Puede administrarse una dosificación adecuada para el tratamiento, según la invención, de una vez, o varias veces a lo largo del tiempo.

20 **Ejemplos**

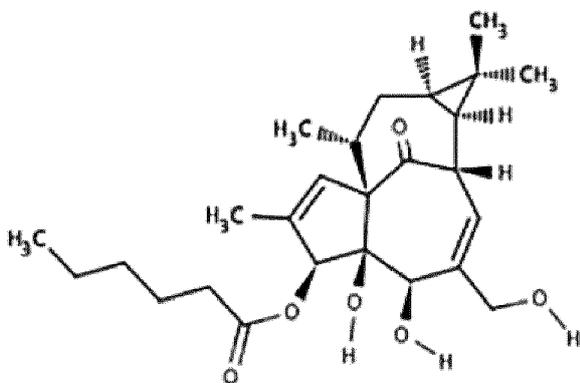
A continuación se proporcionan ejemplos particulares de realizaciones de la invención, que se refieren a algunos derivados de ingenol de fórmula I.

25 En los ejemplos que siguen, se usaron los siguientes derivados de ingenol de fórmula I, ilustrados a continuación, nombrados en el presente documento ingenol A, ingenol B e ingenol C, para facilitar la referencia. Debe observarse que hay indicaciones de conformación estereoespacial para cada compuesto.

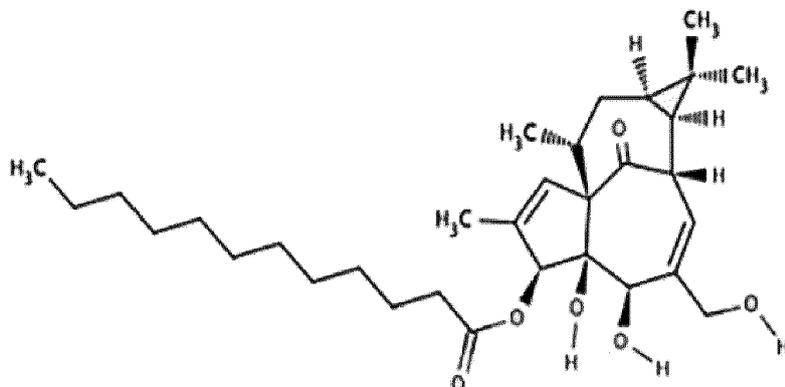
INGENOL A



INGENOL B



INGENOL C



Ejemplo 1

- 5 Se sometieron a prueba varias líneas de células cancerosas *in vitro* (la prueba se describe a continuación) para determinar el 50% de la concentración inhibitoria (CI_{50}), que es la concentración requerida para inhibir el 50% de la actividad celular, en μM (micromoles).

PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS USADAS EN LAS PRUEBAS

- 10 Se cultivaron las células cancerosas sometidas a prueba en medio DEMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) o medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640, ambos suministrados por la empresa norteamericana Life Technologies, complementado con suero bovino fetal al 10% (Life Technologies) y penicilina/estreptomicina al 1% (Life Technologies) en viales de cultivo de 25 o 75 cm^2 , de polietileno o en placas de cultivo, con una densidad promedio de 1×10^6 , a 37°C, el 5% de CO_2 y el 90% de humedad, hasta que se alcanzó la confluencia. Tras la confluencia, se tripsinizaron las células (disolución de tripsina al 0,05%/EDTA 0,53 mM – producto TripLE Express, Life Technologies), se sembraron en placa y se mantuvieron en las condiciones descritas anteriormente para las pruebas que siguen.

- 20 Determinación de la CI_{50} .

- Se usó un ensayo de viabilidad celular en disolución acuosa para esta determinación, usando el producto “Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay”, proporcionado por la empresa norteamericana Promega, descrito por el fabricante como un método colorimétrico para determinar el número de células viables en los ensayos de proliferación o citotoxicidad. CellTiter 96 contiene el compuesto de tetrazolio [(3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna; MTS] y un reactivo de acoplamiento de electrones (etosulfato de fenazina; PES). El PES tiene una estabilidad química mejorada, lo que permite su combinación con MTS para formar una disolución de color estable. La absorbancia medida en diferentes muestras de prueba y de control permite determinar si el número de células vivas en cada muestra es similar. Para este ensayo, se sembraron $3-5 \times 10^3$ células en placas de 96 pocillos, por triplicado, y se añadieron diluciones de los compuestos de la invención (0; 2,5; 5; 7,5, 10 y 20 μM – diluidos en DMSO - dimetilsulfóxido) a las mismas. Se realizaron diluciones del compuesto de modo que las células se sometieron a sólo DMSO al 1%/pocillo. Se midió la absorbancia con un lector de placas de ELISA (equipo Flash Varioskan, proporcionado por la empresa norteamericana Thermo Scientific) a 490 nm tras 72 horas de tratamiento. Se recogieron los datos y se normalizaron en relación con la supervivencia promedio de muestras tratadas sólo con DMSO (se consideró el 100% de viabilidad). Se llevaron a cabo los experimentos en triplicados experimentales y biológicos.

- Se convirtieron los resultados de los valores de absorbancia en porcentaje de viabilidad celular, donde se usaron células en presencia del vehículo (DMSO) como control, correspondiente al 100% de supervivencia. Se llevó a cabo el análisis de regresión no lineal usando el programa Graphpad Prism (proporcionado por la empresa norteamericana Graphpad Software) sobre los resultados de viabilidad, dando como resultado la ecuación usada para calcular la concentración de la sustancia requerida para producir el 50% de reducción de la viabilidad celular (CI_{50}).

- 45 Tal como puede observarse en las figuras 1 a 8, los compuestos derivados de ingenol, según la invención, tienen actividad anticancerígena, demostrada en las pruebas de CI_{50} *in vitro* (el 50% de la concentración inhibitoria máxima) para un gran número de líneas de cáncer.

- 50 Tal como puede observarse en la figura 9, los productos de las pruebas llevadas a cabo con derivados de ingenol de la invención, en comparación con temozolomida, un producto antitumoral usado en la clínica de oncología para tratar

cáncer de cerebro, fueron más potentes y eficaces.

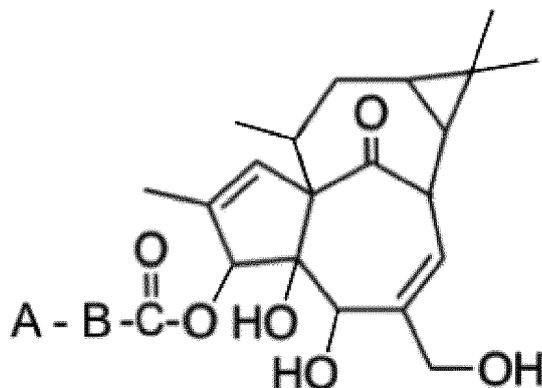
5 Un experto en la técnica puede evaluar fácilmente, por medio de las enseñanzas contenidas en el presente documento, las ventajas de la invención, y sabrá cómo proponer modificaciones y alternativas equivalentes a las realizaciones que no se describieron expresamente sin salirse del alcance de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Compuestos derivados de ingenol, caracterizados porque tienen la fórmula I

5

FÓRMULA I



en la que A es fenilo, CH₃- o CH₂=CH-, y B es -CH=CH-, [-CH₂]_x o [-CH₂]_y,

10

donde x es un número entero que oscila entre 1 y 10,

donde y es un número entero que oscila entre 1 y 10,

siempre que:

15

cuando A es fenilo, B es -CH=CH-;

cuando A es CH₃-, B es [-CH₂]_x;

20

cuando A es CH₂=CH-, B es [-CH₂]_y para su uso en el tratamiento de cáncer.

2. Compuestos derivados de ingenol de fórmula I para su uso, según la reivindicación 1, caracterizados porque el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, coriocarcinoma, cáncer de cuello uterino, leucemia, cáncer de piel.

25

3. Compuestos derivados de ingenol de fórmula I para su uso, según la reivindicación 1, caracterizados porque x varía entre 2 y 6 e y varía entre 8 y 10.

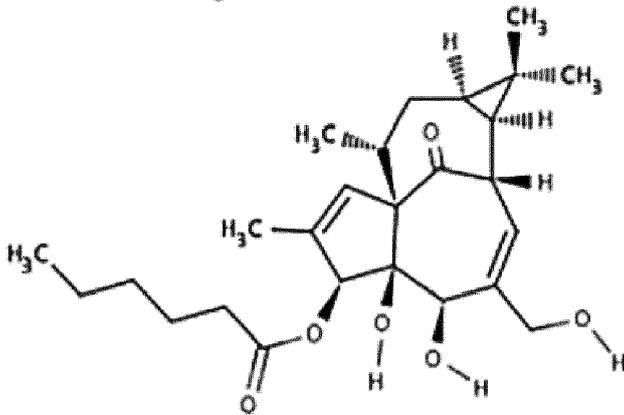
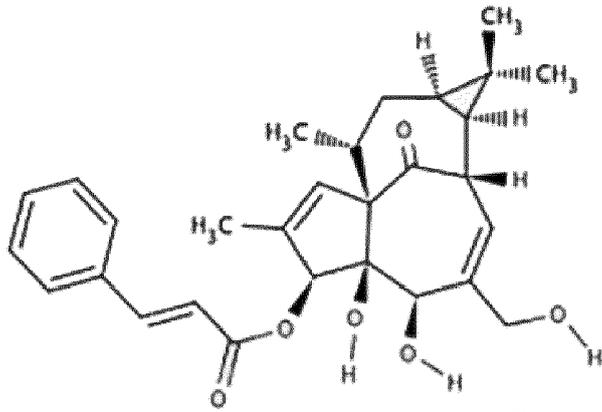
30

4. Compuestos derivados de ingenol de fórmula I para su uso, según la reivindicación 1, caracterizados porque son uno o más de 3-cinnamil-ingenol, 3-hexanoil-ingenol, 3-dodecanoil-ingenol o 3-dodeca-11-enoil-ingenol.

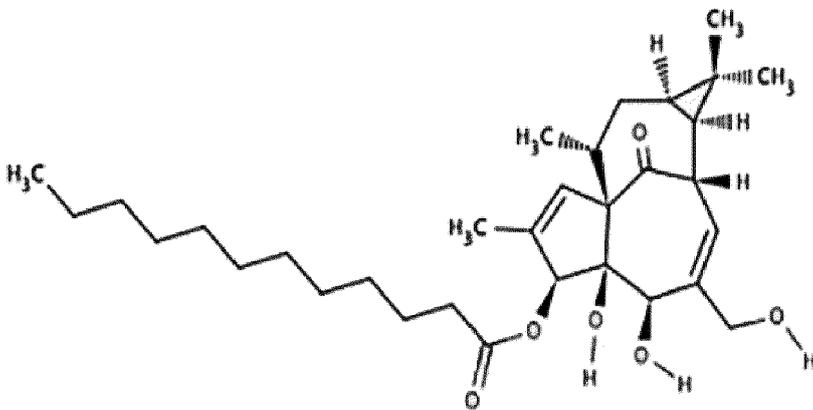
35

5. Compuestos derivados de ingenol de fórmula I para su uso, según la reivindicación 1, caracterizados porque son hidratos, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula I.

6. Compuestos derivados de ingenol para su uso, según la reivindicación 1, caracterizados porque comprenden una de las siguientes estructuras



o



- 5
7. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende uno o más compuestos derivados de ingenol de fórmula I y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, caracterizada porque contiene al menos un principio activo adicional distinto del compuesto de fórmula I y elegido de entre un agente antitumoral, antibiótico, agente anticaquexia, principio activo neurológico, agente antidiabético, agente antihipertensor e inhibidores de la bomba de protones.
 8. Forma de dosificación para su uso en el tratamiento de cáncer, caracterizada porque comprende entre 0,01 y 5000 mg de uno o más compuestos de fórmula I según la reivindicación 1.

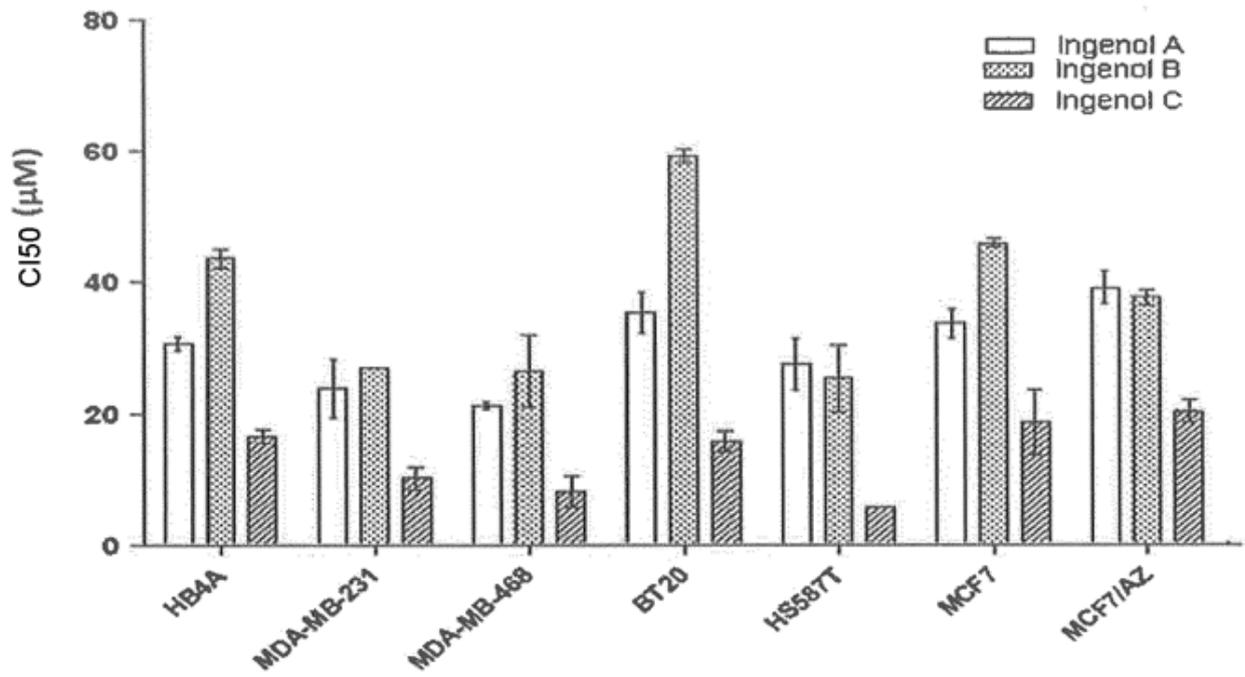


FIG. 1

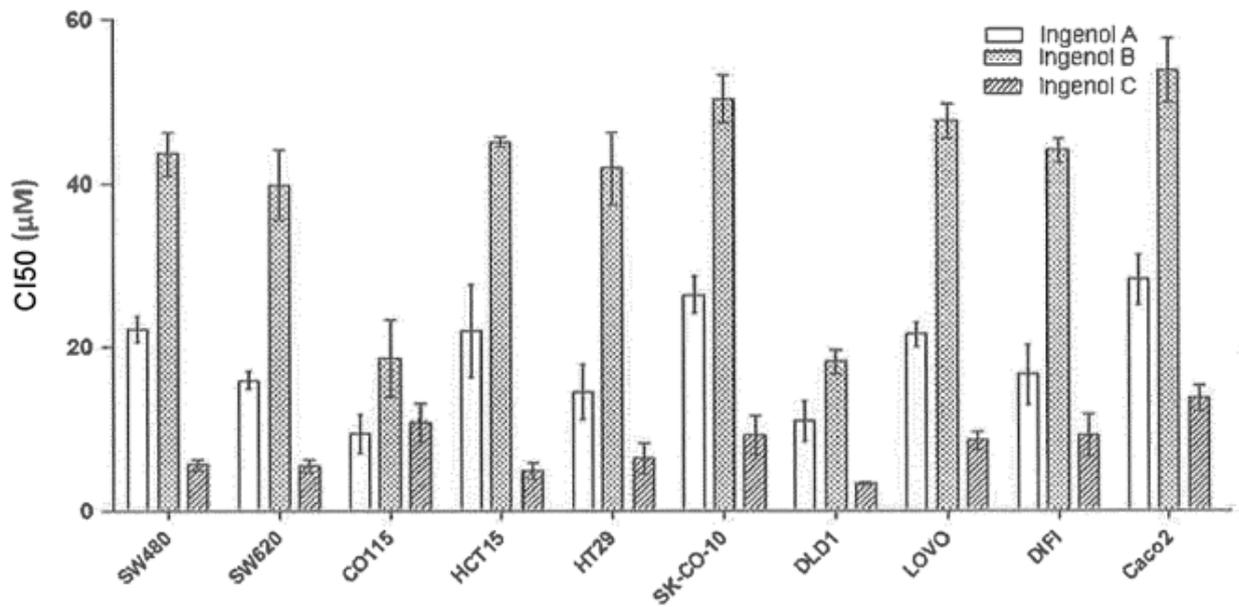


FIG. 2

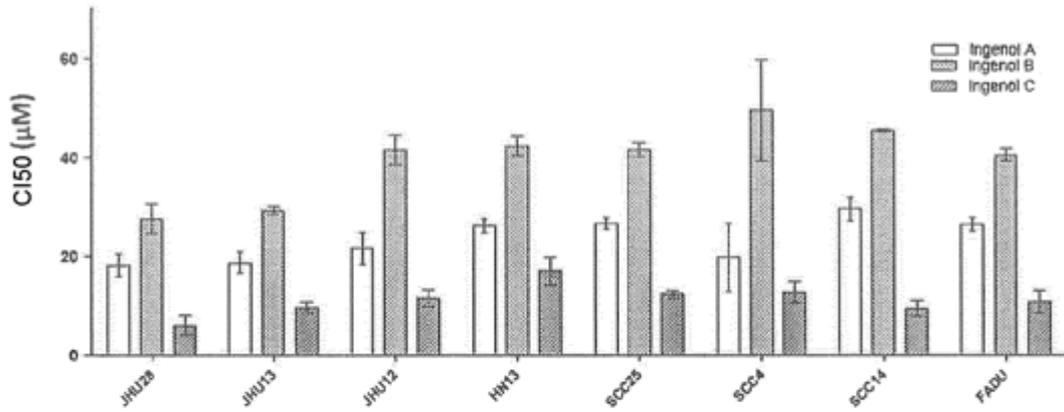


FIG. 3

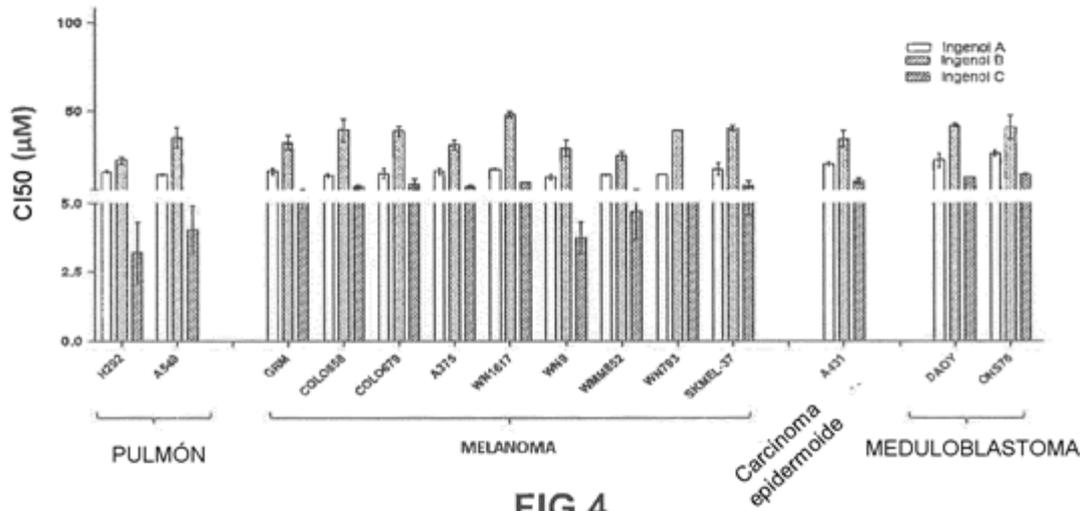


FIG.4

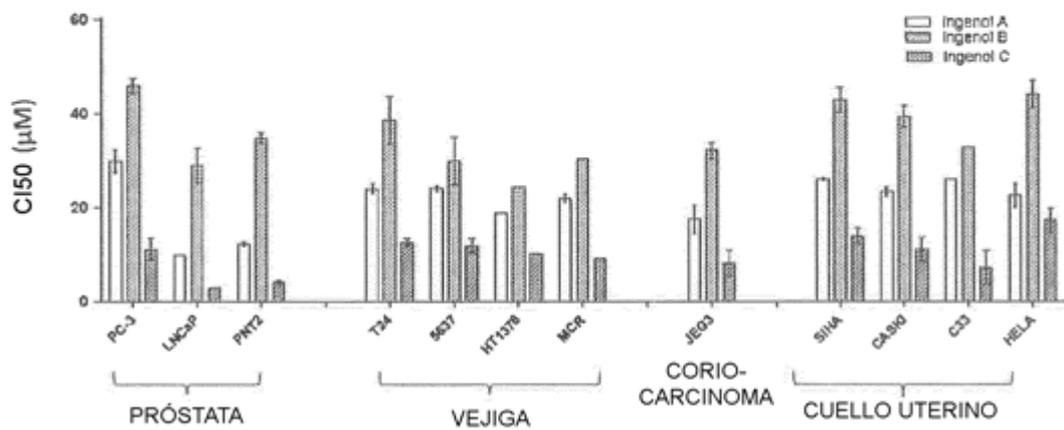


FIG.5

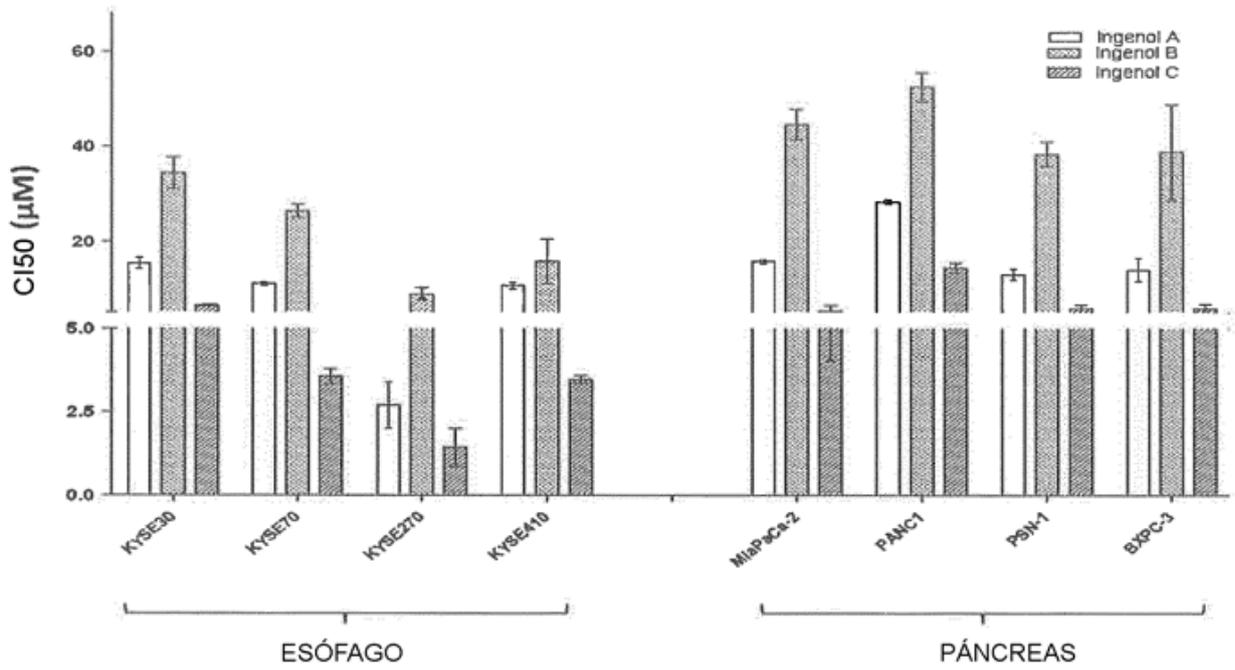


FIG. 6

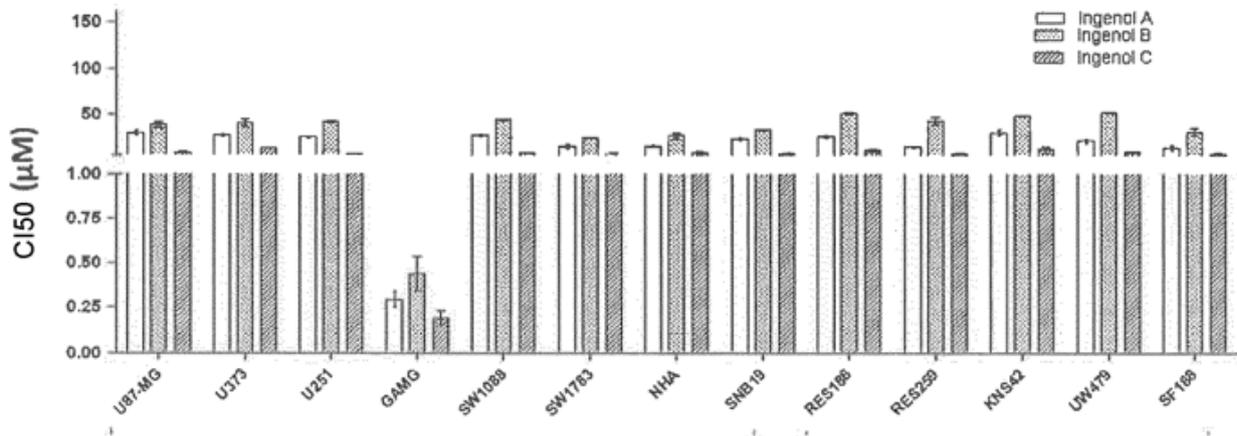


FIG. 7

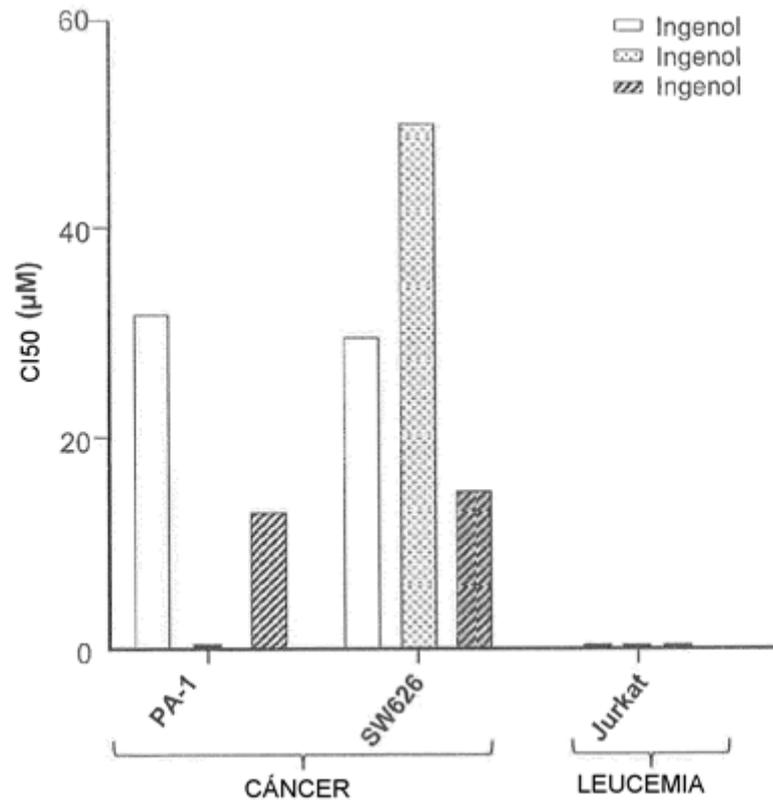


FIG. 8

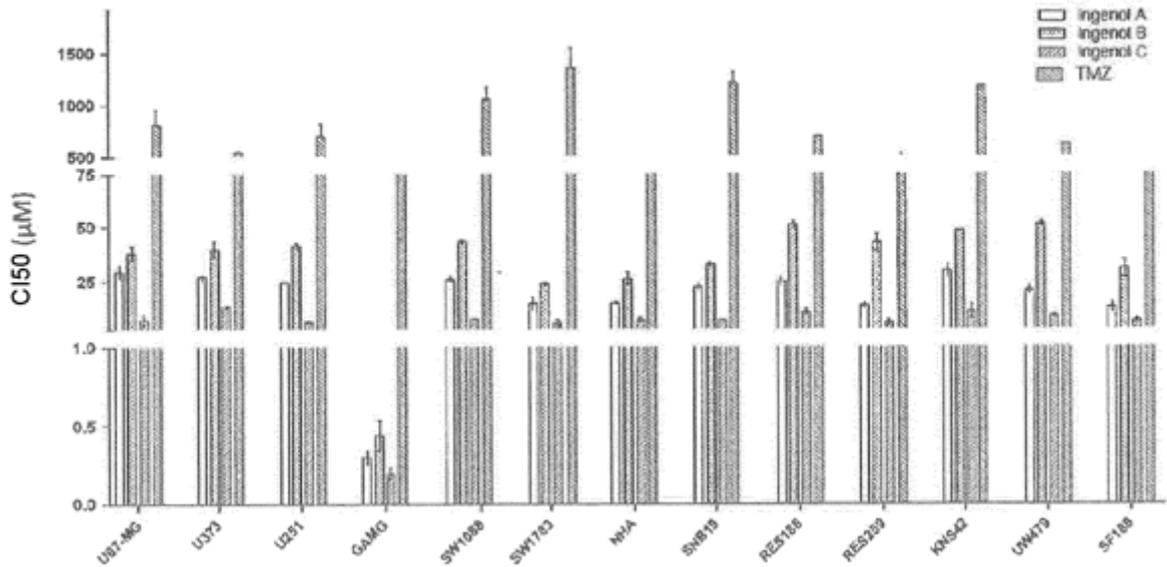


FIG. 9