



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 333 836**

② Número de solicitud: 200802523

⑤ Int. Cl.:
A61K 31/341 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **29.08.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2010**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.03.2010

⑦ Solicitante/s: **Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III
c/ Melchor Fernández Almagro, 3
28028 Madrid, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas y
Universidad Complutense de Madrid**

⑦ Inventor/es: **Hortelano Blanco, María Sonsoles;
López Fontal, Raquel;
Rodríguez González, Benjamín y
Heras Polo, Beatriz de las**

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Compuestos antitumorales.**

⑤ Resumen:

Compuestos antitumorales.

La invención proporciona una serie de compuestos con estructura de diterpenoides de tipo labdano que son capaces de provocar la activación de caspasa-8 y, por tanto, inducen la apoptosis de células tumorales. La invención se relaciona también con el uso de dicho compuestos para el tratamiento de enfermedades asociadas a una proliferación celular indeseada así como a métodos para inducir la apoptosis en células en cultivo y para la identificación de compuestos con actividad anti-apoptótica.

ES 2 333 836 A1

DESCRIPCIÓN

Compuestos antitumorales.

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se encuadra dentro del campo de la proliferación celular y, más concretamente, en el campo de compuestos capaces de inhibir la proliferación celular indeseada mediante la inducción de apoptosis.

10 **Antecedentes de la invención**

Los terpenoides suponen la clase de compuestos más extensa y abundante existente en la naturaleza. Se extraen de plantas superiores, musgos, algas y líquenes y se pueden encontrar asimismo en insectos, microbios u organismos marinos. Algunos terpenoides han sido ya empleados con propósitos terapéuticos durante siglos, y en las últimas décadas, la actividad investigadora dentro del campo clínico de esta clase de compuestos ha aumentado constantemente. Los labdanos, compuestos diterpenoides bicíclicos, muestran un amplio espectro de actividades biológicas incluyendo acción antibacteriana, antiviral y anti-inflamatoria [Chinou, I., *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12(11), 1295-1317]. Estos compuestos exhiben efectos anti-inflamatorios mediante la inhibición de la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) [Girón, N. *et al.*; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008, 228, 179-189]. Sin embargo, a día de hoy no existen datos que caractericen la posible interacción de los diterpenoides de tipo labdano con el mecanismo de muerte celular apoptótico.

La apoptosis es un proceso de suicidio celular conservado evolutivamente, esencial para la homeóstasis del tejido normal desempeñando un papel importante en la eliminación de células potencialmente dañinas, incluyendo los precursores de células tumorales [Song Z. *et al.*, *Trends Cell Biol.*, 1999, 9(12), M49-52]. Existen fundamentalmente dos mecanismos de inducción de apoptosis, denominados mecanismo extrínseco e intrínseco [Nicholson, DW., *Cell Death Differ.*, 1999, 6(11), 1028-42]. El mecanismo extrínseco se inicia mediante la activación de un conjunto de receptores de superficie conocidos con el nombre de receptores de muerte. Los receptores de muerte son proteínas de membrana de tipo II, que pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), siendo los mejor caracterizados, CD95 también llamado Fas o Apo-1, TNF-R1 (receptor 1 del factor de necrosis tumoral) y TRAIL-R2 (ligando de inducción de apoptosis relacionado con TNF (del inglés TNF-related apoptosis inducing ligand)).

La iniciación de los procesos apoptóticos a través de los receptores de muerte, implica el reclutamiento de moléculas adaptadoras, tales como FADD, TRADD, RAIDD, Daxx, RIP, que van a reclutar y activar a su vez a una serie de cisteinas proteasas, denominadas caspasas, en concreto a la procaspasa 8, en un complejo que señala la inducción de muerte (death-inducing signaling complex o DISC) [Peter, ME., *Curr. Opin. Immunol.*, 1998, 10(5), 545-51]. La caspasa 8 activa a su vez a otros miembros de la familia, tales como las caspasas 3, 6 y 7 [Enari, M. *et al.*, *Nature*, 1996, 380(6576), 723-6], poniendo en marcha una cascada de señalización que culmina con la fragmentación del DNA.

El mecanismo intrínseco está mediado por la mitocondria e involucra la liberación de factores proapoptóticos tales como el citocromo *c*, el factor inductor de apoptosis (AIF) y Smac/DIABLO del espacio intramembrana al citosol. Una vez liberado, el citocromo *c* y dATP se unen al factor-1 apoptótico activador de la proteinasa (Apaf 1) y a la procaspasa 9, formando un complejo denominado apoptosoma. Este complejo, junto con nucleótidos de adenina, provoca la autoactivación de la procaspasa-9 a caspasa 9, que a su vez, activa las caspasas 2, 3, 6, 8 y 10 [Slee, EA. *et al.*, *Cell Death Differ.*, 1999, 6(11), 1067-74].

Existe un nexo de unión entre los mecanismos extrínseco e intrínseco, que viene determinado por la activación de un miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2, en concreto Bid. Bid es activado por la caspasa 8 mediante una ruptura proteolítica para generar un Bid truncado que activa la vía de señalización mitocondrial [Yuan, J., *Cell*, 1998, 94(4), 491-501].

Un mecanismo adicional de regulación de la apoptosis es el mediado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) [Korsmeyer, SJ., *Trends Genet.*, 1995, 11(3), 101-5]. Numerosos grupos han sugerido que la generación intracelular de ROS constituye un episodio apoptótico conservado, y se menciona la producción de ROS como un determinante crítico de la toxicidad asociada a la exposición a radiación ionizante y a fármacos quimioterapéuticos [Park, KK. *et al.*, *Mutat. Res.*, 2003, 542:89-97]. La mayoría de los agentes que inducen apoptosis liberan ROS, incluyendo óxido nítrico (NO), anión superóxido (O_2^-) y H_2O_2 . Se han propuesto distintos mecanismos para elucidar la inducción de apoptosis mediada por ROS; un modelo bien establecido involucra la activación de la vía de señalización mitocondrial a través de la supresión del potencial mitocondrial de membrana y la liberación del citocromo *c* [Stridh, H. *et al.*, *FEBS Lett.*, 1998, 429:351-5]. Además, también se ha descrito que los ROS regulan la expresión de los receptores de muerte [Jung, EM. *et al.*, *Carcinogenesis*, 2005, 26:1905-13] y activan a factores de transcripción nuclear, tales como NF- κ B, AP-1 y p53, que pueden regular la expresión de las proteínas de muerte o de los inhibidores de proteínas de supervivencia [Dumont, A. *et al.*, *Oncogene*, 1999, 18:(3), 747-57].

A la vista de los mecanismos involucrados en la activación de la apoptosis, es de gran importancia el desarrollo de fármacos que sean capaces de regular dichas vías de señalización y que permitan inducir la muerte celular en células de proliferación no deseada, tales como las células tumorales. Aunque se han investigado durante décadas algunos productos naturales como potenciales fármacos antitumorales [Mann, J., *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2(2), 143-

8], la complejidad genética de los cánceres humanos obliga a reenfocar los esfuerzos para desarrollar nuevos fármacos multifuncionales, no solo monofuncionales, para su uso tanto terapéutico como preventivo. En este sentido, se ha demostrado recientemente que triterpenoides sintéticos de oleanano muestran pronunciados efectos sobre la inflamación y el estado redox de células y tejidos, y son potenciales agentes anti-proliferativos y proapoptóticos [Liby, KT., *Nat. Rev. Cancer*, 2007, 7(5), 357-69]. Otros estudios han mostrado que la inhibición de NF- κ B potencia la eficacia de los efectos antitumorales de la radiación ionizante y de algunos compuestos quimioterapéuticos [Wang, CY. *et al.*, *Nat. Med.*, 1999, 5(4), 412-7; Wang, CY. *et al.*, *Science*, 1996, 274(5288), 784-7]. NF- κ B es un factor de transcripción cuya actividad se requiere para la inducción de más de 150 genes involucrados en el crecimiento, diferenciación y apoptosis celular. NF- κ B está constituido por homo y heterodímeros de varias proteínas de la familia Rel, aunque las formas activas más abundantes están formadas por dímeros de p50/RelA (p50/p65). En condiciones normales, NF- κ B se encuentra retenido en el citosol de las células, unido a las proteínas inhibitoras I κ B que enmascaran su sitio de unión al DNA. Diversos estímulos tales como TNF- α , lipopolisacárido (LPS), IL-1, etc, son capaces de activar a las I κ B quinasas, provocando la fosforilación de los I κ Bs, su ubiquitinización y su degradación en el proteasoma, lo que permite que NF- κ B se transloque al núcleo activando numerosos genes entre los que se encuentran también genes antiapoptóticos. Ensayos recientes indican que algunos terpenoides, incluyendo diterpenos y sesquiterpenos de tipo kaurano inhiben la vía de activación de NF- κ B [Castrillo, A. *et al.*, *Biol. Chem.*, 2001, 276:15854-60; Lee, JH. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 2006, 72(10), 1311-21; Lee, JH. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(21), 18411-20; Lyss, G. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(50), 33508-16], lo que puede contribuir a la inhibición de genes antiapoptóticos.

A pesar de estos estudios, existe aún la necesidad de desarrollar compuestos que permitan activar el mecanismo de muerte celular apoptótico y participar así en la eliminación de células potencialmente dañinas, incluyendo los precursores de células tumorales.

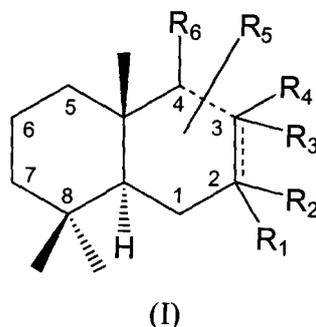
Compendio de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado que diterpenoides de tipo labdano que responden a la fórmula (I) descrita más abajo inducen apoptosis en macrófagos y en diversas líneas tumorales tales como células Jurkat, células HT-29 y en la línea de tipo macrófágico RAW 264.7.

Los diterpenos de tipo labdano son capaces de activar a la caspasa 8 a través de la vía de señalización de receptores de muerte. Además, la caspasa 8 activada provoca la ruptura de Bid, lo que induce la vía de señalización mitocondrial o intrínseca, conduciendo a un descenso en el potencial de membrana mitocondrial, a la liberación de factores apoptóticos de la mitocondria al citosol y a la consiguiente activación de las caspasas 9 y 3. Los ensayos realizados demuestran que la inhibición de la caspasa 8 bloquea estos procesos, lo que sugiere que el mecanismo extrínseco de los receptores de muerte juega un papel crítico en los episodios apoptóticos inducidos por los diterpenoides de tipo labdano. Además, las células pretratadas con anticuerpos neutralizantes contra ligando de Fas, TNF-R1 (receptor 1 del factor de necrosis tumoral) y TRAIL-R2 (receptor 2 del ligando de inducción de apoptosis relacionado con TNF) han permitido inhibir la apoptosis inducida por dichos diterpenoides, indicando que dicha apoptosis es dependiente de dichos receptores de muerte.

A la vista de los datos obtenidos a partir de los diferentes ensayos realizados, y dada la capacidad de los diterpenoides de labdano para inducir apoptosis, dichos compuestos se presentan como potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades en las que se hace necesario inhibir la proliferación anormal de células potencialmente dañinas.

Así, en un primer aspecto la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



donde:

----- significa ausencia de enlace, un enlace sencillo o un enlace doble;

===== significa un enlace sencillo o un enlace doble;

con la condición de que ambos no pueden ser a la vez un doble enlace;

ES 2 333 836 A1

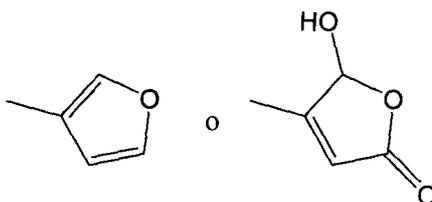
R₁ y R₂ son independientemente, hidrógeno, hidroxilo, un grupo alquilo C₁-C₆ o juntos forman un grupo =O, con la condición de que uno de ellos no existe cuando ----- es un doble enlace;

R₃ es un grupo alquilo C₁-C₆ con la condición de que R₃ no existe cuando ----- es un doble enlace y el radical R₅ está ubicado en posición 3;

R₄ es hidrógeno o puede formar junto con R₆ un grupo epoxi cuando - - - - - es un enlace sencillo; con la condición de que R₄ no existe cuando ----- es un doble enlace;

R₆ es hidroxilo o un grupo =O cuando - - - - - significa ausencia de enlace, o puede formar junto con R₄ un grupo epoxi cuando - - - - - es un enlace sencillo; con la condición de que R₆ no existe cuando - - - - - es un enlace doble y el radical R₅ está ubicado en la posición 4;

R₅ es un grupo -(CH₂)₁₋₄-R₇ ubicado en la posición 3 ó 4, donde R₇ es:



o una sal, solvato o isómero farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a una proliferación celular indeseada.

En una realización particular, la enfermedad asociada a una proliferación celular indeseada se selecciona entre cáncer, restinosis, arterioesclerosis, enfermedades angiogénicas, fibrosis, enfermedades dermatológicas y enfermedades inflamatorias.

En un segundo aspecto, la invención se dirige a un procedimiento *in vitro* para inducir apoptosis en células cuya proliferación es indeseable, que comprende poner en contacto dichas células con un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, en ausencia del lipopolisacárido LPS.

En un tercer aspecto, la invención se dirige a un procedimiento para la identificación de inhibidores de apoptosis que comprende

- (i) poner en contacto una población celular con un compuesto de fórmula (I) como se define anteriormente y de un compuesto candidato
- (ii) determinar la tasa de apoptosis en la población celular

en donde una disminución de la tasa de apoptosis en dicha población celular en presencia del compuesto candidato con respecto a una población control es indicativa de que dicho compuesto candidato es capaz de inhibir la apoptosis.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Porcentaje de apoptosis inducida en células RAW 264.7 mediante los 11 diterpenoides derivados de labdano empleados en la presente invención. Los datos corresponden con la media \pm desviación estándar de tres experimentos distintos llevados a cabo por triplicado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ con respecto a las condiciones de control.

Figura 2: Viabilidad celular de células RAW 264.7, Jurkat y HT-29 en presencia de concentraciones crecientes de T2 y andrografolido. La línea discontinua indica el valor de 50% de viabilidad usado para determinar la IC₅₀.

Figura 3: Porcentaje de necrosis y de células viables en macrófagos tras el tratamiento con los diterpenoides T6 y T7. Las células RAW 264.7 se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas de los distintos terpenoides durante 24 h, determinándose el porcentaje de células vivas por citometría de flujo tras tinción de las células con yoduro de propidio. Para determinar el grado de necrosis se analizaron mediante kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) los niveles de enzima lactato deshidrogenada (LDH) liberados al medio. Los datos corresponden con la media \pm desviación estándar de tres experimentos distintos llevados a cabo por triplicado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ con respecto a las condiciones de control.

Figura 4: Perfil de expresión de 9 genes (TNF-R1, TRAIL-R2, Fas, CD40, Bax, Bak, Bid, Bcl-2 y Bcl-x1) relacionados con apoptosis en macrófagos tras el tratamiento con el compuesto T6. Los gráficos muestran los niveles de expresión relativa de los genes seleccionados bajo condiciones experimentales. Los datos se muestran como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Figura 5: Inducción por los compuestos T6 y T7 de la actividad de caspasa 8 y de la vía de señalización mitocondrial en la línea celular RAW 264.7. A) La Figura 5A muestra la actividad de caspasa 8 en extractos celulares de la línea RAW 264.7 incubada con los compuestos T6 y T7 determinada mediante fluorimetría utilizando Ac-IETD-AMC como sustrato fluorogénico. B) La Figura 5B muestra (en porcentaje) el cambio en el potencial de membrana mitocondrial medido mediante citometría de flujo con TMRM fluorescente en células RAW 264.7 estimuladas como en A), empleando el agente mCICCP (10 μ M) como control positivo. C) La Figura 5C muestra la expresión de las proteínas Bid, Bcl-2, Bcl-x1 y citocromo c relacionadas con apoptosis determinada en los tiempos indicados mediante Western blot en extractos citosólicos. La carga de la proteína se ha normalizado con respecto a la expresión de la β -actina. D) y E) Las figuras 5D y 5E muestran, respectivamente, la actividad caspasa 9 y caspasa 3 en extractos celulares determinada fluorométricamente. Los datos corresponden con la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto a las condiciones de control (A, B, D, E).

Figura 6. Porcentaje de la actividad de caspasa 8 inducida por los compuestos T1-T11. La actividad de caspasa 8 se determinó en extractos celulares de la línea RAW 264.7 mediante fluorimetría utilizando Ac-IETD-AMC como sustrato fluorogénico. Los datos corresponden con la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto a las condiciones de control.

Figura 7. Porcentaje de la actividad de caspasa 9 inducida por los compuestos T1-T11. La actividad de caspasa 9 se determinó en extractos celulares de la línea RAW 264.7 mediante fluorimetría utilizando Ac-LEHD-AMC como sustrato fluorogénico. Los datos corresponden con la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto a las condiciones de control.

Figura 8. Porcentaje de la actividad de caspasa 3 inducida por los compuestos T1-T11. La actividad de caspasa 3 se determinó en extractos celulares de la línea RAW 264.7 mediante fluorimetría utilizando Ac-DEVD-AMC como sustrato fluorogénico. Los datos corresponden con la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto a las condiciones de control.

Figura 9. La Figura 9 muestra en general cómo la inhibición de la caspasa 8 previene la apoptosis inducida por diterpenoides de tipo labdano. A) La Figura 9A muestra la actividad de la caspasa 8 determinada mediante citometría de flujo en células RAW 264.7 pretratadas con 100 μ M de Ac-IETD-Cho durante 1 hora antes del tratamiento con el compuesto T6. B) La figura 9B muestra el porcentaje de células RAW 264.7 que han sufrido apoptosis tras ser tratadas como en A). La apoptosis se determinó por citometría de flujo tras tinción de las células con yoduro de propidio. C) La figura 9C muestra los niveles de expresión de Bid, Bcl-2 y citocromo c determinados mediante Western blot en extractos citosólicos de células RAW 264.7 pretratadas durante 1 h con Ac-IETD-CHO y estimuladas posteriormente con 25 μ M del compuesto T6 durante 6 horas. D) La Figura 9D muestra (en porcentaje) el cambio en el potencial de membrana mitocondrial de células RAW 264.7 estimuladas como en C), medido mediante citometría de flujo tras tinción con TMRM (tetrametil rodamina), empleando el agente desacoplante mCICCP (10 μ M) como control positivo. Las figuras 9E y 9F muestran, respectivamente, la actividad caspasa 9 y caspasa 3 determinada mediante fluorimetría en extractos celulares. Los datos corresponden a la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto a las condiciones de control (A, B, D, E, F); *b, P < 0.01 vs. T6 (D, E, F).*

Figura 10. La Figura 10 muestra en general cómo los anticuerpos neutralizantes contra los receptores de muerte inhiben la apoptosis inducida por diterpenoides. A) La Figura 10A muestra el porcentaje de apoptosis tras tinción con yoduro de propidio en células RAW 264.7 pretratadas durante 1 hora con anticuerpos neutralizantes (20 μ g/mL) contra el ligando de Fas, y los receptores TNF-R1 y TRAIL-R2, (tanto solos como en combinación), y posterior estimulación con el compuesto T6 (25 μ M, durante 6 horas). B) La figura 10B muestra fotografías representativas de un experimento en las que se aprecia las alteraciones morfológicas en respuesta al tratamiento con T6 con y sin anticuerpos neutralizantes en las mismas condiciones que en A. C) La figura 10C muestra la actividad de la caspasa 8 determinada mediante fluorimetría en extractos celulares obtenidos de células RAW 264.7 tratadas como en A. D) La figura 10D muestra los niveles de expresión Bid y Bcl-2 en extractos citosólicos obtenidos de células RAW 264.7 tratadas como en A, determinados mediante Western blot utilizando β -actina como control. Los datos en A y C son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto al compuesto T6 solo. Los datos en B y D muestran una imagen representativa de tres experimentos.

Figura 11. La figura 11 muestra en general cómo la apoptosis inducida en células RAW 264.7 por los diterpenoides empleados en la invención es independiente de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). A) La figura 11A muestra la liberación de NO en el medio de cultivo de células RAW 264.7 incubadas con 25 μ M de T6 o T7 durante 24 horas, determinada a partir de la acumulación de nitritos y detectada mediante la reacción de Griess, empleando la estimulación con LPS (250 ng/mL) como control positivo. B) La figura 11B muestra la intensidad de fluorescencia de células RAW 264.7 tratadas con 25 μ M de T6 o T7 durante 6 horas y marcadas con hidrotidina (HE) con el fin de estimar la liberación de ROS, en concreto de anión superóxido (O_2^-). C) La figura 11C muestra los cambios en la fluorescencia del compuesto diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) empleado como marcador de la producción de H_2O_2 en células RAW 264.7 pretratadas con 10 mM de N-acetil-cisteína (NAC) durante 1 hora y tratadas posteriormente con 25 μ M de T6 o T7. D) La figura 11D muestra el porcentaje de células apoptóticas determinado mediante citometría de flujo tras haber marcado las células tratadas como en C) con yoduro de propidio. E) La figura 11E muestra los cambios en la fluorescencia del compuesto DCFH-DA empleado como marcador de la producción de H_2O_2 en células RAW 264.7 pretratadas con 10 mM de NAC durante 1 hora seguido de incubación

con 25 μM de T6. F) La figura 11F muestra el porcentaje de apoptosis determinado mediante citometría de flujo tras tinción con yoduro de propidio, en células RAW 246.7 pretratadas con 10 mM de NAC durante 1 hora e incubadas posteriormente con 25 μM de T6. Los datos corresponden a la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto a la condición de control.

Figura 12. La figura 12 muestra en general cómo el compuesto T6 induce la apoptosis en macrófagos peritoneales aislados de ratones inyectados con tioglicolato y tratados con las concentraciones indicadas de los diterpenoides T6 o T7 durante 24 horas. A) La figura 12A muestra el porcentaje de células apoptóticas determinado mediante citometría de flujo tras tinción con yoduro de propidio. B,C,D) Las figuras 12B, 12C y 12D muestran, respectivamente, la actividad de las caspasas 8, 9 y 3 determinada fluorométricamente en los extractos celulares. Los datos corresponden a la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ con respecto a la condición de control.

Descripción detallada de la invención

En el contexto de la presente invención, el término “alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ ” se refiere a un radical hidrocarbonado lineal o ramificado que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturación, que tiene de uno a seis átomos de carbono y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo. Ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo, pentilo y hexilo.

A menos que se afirme lo contrario, con los compuestos empleados en la invención se tiene la intención de que incluyan compuestos que difieren solamente en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, compuestos que tienen las presentes estructuras excepto por la sustitución de un hidrógeno por un deuterio o un tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C están dentro del ámbito de esta invención.

El término “sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo” se refiere a sales o solvatos que, en su administración al receptor, son capaces de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal y como el que se encuentra descrito aquí. No obstante, se apreciará que las sales y solvatos farmacéuticamente inaceptables también caen dentro del alcance de la invención, ya que éstas pueden ser útiles para la preparación de sales y solvatos farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales, solvatos y derivados puede ser llevada a cabo mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Preferiblemente, “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que son tolerables fisiológicamente y no producen típicamente una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar, tal como trastorno gástrico, mareo y similares, cuando se administran a un humano. Preferiblemente, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o recogido en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, y más particularmente en humanos.

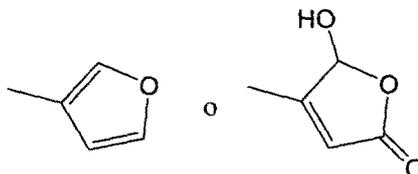
Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos anteriormente en el presente documento son sintetizadas a partir del compuesto descrito anteriormente que contenga una unidad ácida mediante métodos químicos convencionales. En general, tales sales son preparadas, por ejemplo, reaccionando dicha forma ácida libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos. En general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de sales de adición alcalinas incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y sales alcalinas orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, *N,N*-dialquilenetanolamina, glucamina y sales aminoácidas básicas.

Los compuestos empleados en la invención pueden estar en forma cristalina, ya sea como compuestos libres, o como solvatos (por ejemplo, hidratos) y se entiende que ambas formas están dentro del ámbito de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos en el arte. Los solvatos adecuados son solvatos farmacéuticamente aceptables. En una realización particular el solvato es un hidrato.

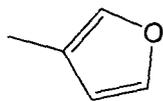
Los compuestos empleados en la invención representados por la fórmula (I) arriba descrita pueden incluir enantiómeros dependiendo de la presencia de centros quirales o isómeros dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, *Z*, *E*). Los isómeros individuales, enantiómeros o diastereómeros y mezclas de los mismos están dentro del alcance de la presente invención.

En una realización preferente de la invención, R_1 es hidroxilo o forma junto con R_2 un grupo =O.

En otra realización preferente, R_3 es un grupo $-(\text{CH}_2)_2\text{-R}_7$ ubicado en la posición 4, donde R_7 es:



más preferentemente R₇ es:

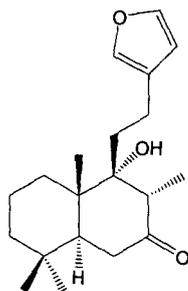


5

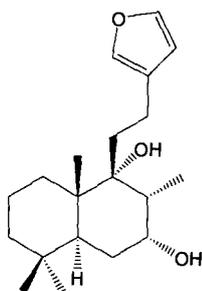
10

En otra realización aún más preferente, el compuesto de fórmula (I) se selecciona entre los siguientes compuestos:

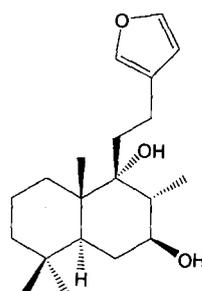
15



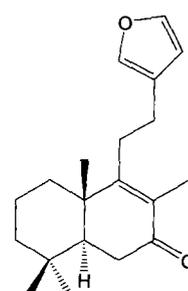
T1



T2

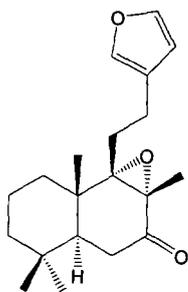


T3

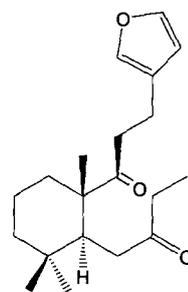


T4

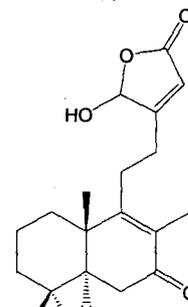
25



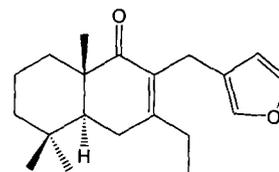
T5



T6



T8



T11

35

40

Los compuestos de fórmula (I) empleados en la presente invención pueden ser preparados mediante el procedimiento descrito por García Alvarez, MC. *et al.*, en *Anales de Química*, 1981, 77, 316-9.

45

En una realización particular, para su administración en el tratamiento de enfermedades asociadas a una proliferación celular indeseada, los compuestos de fórmula (I), sus sales farmacéuticamente aceptables y/o solvatos, se formulan en una composición farmacéutica apropiada, en la cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más transportadores, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

50

El término "transportador, adyuvante y/o vehículo" se refiere a entidades moleculares o sustancias con las que se administra el ingrediente activo. Tales transportadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como aguas y aceites, incluyendo aquellas de petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, excipientes, disgregantes, agentes humectantes o diluyentes. Se describen transportadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

55

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), rectal, etc., típicamente, por vía oral debido al carácter crónico de la enfermedad a tratar.

60

En una realización particular, dichas composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma farmacéutica de administración por vía oral, bien en forma sólida o líquida. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada.

65

ES 2 333 836 A1

Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro “*Tratado de Farmacia Galénica*”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

5 Para su aplicación en terapia el compuesto de fórmula (I), o sus sales o solvatos, se encontrarán preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura. Como forma farmacéuticamente aceptable se entiende, *inter alia*, que tienen un nivel farmacéuticamente aceptable de pureza, excluyendo aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y excipientes, y sin incluir ningún material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el fármaco están preferiblemente por encima del 50%, más preferiblemente por encima del 70%, y aún más preferiblemente por encima del 90%. En una realización preferida está por encima del 95% del compuesto de fórmula (I), o de sus sales o solvatos.

15 En general, la cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de fórmula (I) a administrar dependerá, entre otros factores, del individuo que vaya a ser tratado, de la severidad de la enfermedad que padezca dicho individuo, de la forma de administración elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben ser consideradas tan solo como guías para el experto en la materia, y éste debe ajustar las dosis en función de las variables citadas anteriormente. No obstante, se puede administrar un compuesto de fórmula (I), una o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 veces al día, en una cantidad típica total diaria comprendida entre 0.1 y 1000 mg/kg masa corporal/día, preferentemente 10 mg/kg masa corporal/día.

20 El compuesto de fórmula (I), sus sales farmacéuticamente aceptables y/o solvatos, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a una proliferación celular indeseada. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 En el contexto de la presente invención, una “enfermedad asociada a una proliferación celular indeseada” incluye el crecimiento, progresión y la metástasis de cáncer y tumores.

30 En una realización particular, la enfermedad asociada a una proliferación celular indeseada se selecciona entre cáncer, restinosis, arterioesclerosis, enfermedades angiogénicas, fibrosis, enfermedades dermatológicas y enfermedades inflamatorias.

35 Los términos “cáncer” y “tumor” se refieren a la condición fisiológica en mamíferos caracterizada por el crecimiento celular desregulado. Los compuestos de la presente invención tienen utilidad para el tratamiento de tumores de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza, cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos e hígado. En particular, tumores que pueden ser tratados con los compuestos de la invención incluyen adenoma, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma epitelial, germinoma, glioblastoma, glioma, hemangioendotelioma, hemangiosarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leucemia, linfoma, meduloblastoma, melanoma, neuroblastoma, osteosarcoma, retinoblastoma, rhabdomiosarcoma, sarcoma y teratoma. En particular, el tumor/cáncer se selecciona del grupo de melanoma acral lentiginoso, queratosis actínica adenocarcinoma, carcinoma adenoidal cística, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de la glándula de Bartolino, carcinoma de células basales, carcinoma de glándulas branquiales, carcinoide capilar, carcinoma, carcinosarcoma, colangiocarcinoma, cistadenoma, tumor del seno endodrmal, hiperplasia endometrial, sarcoma del estroma endometrial, adenocarcinoma endometroide, sarcoma ependial, sarcoma de Swing, hiperplasia nodular focal, gastrónoma, tumores de la línea germinal, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastoma, hemangioendotelioma, hemangioma, adenoma hepático, adenomastosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulinita, neoplasia intraepitelial, neoplasia de células escamosas interepiteliales, carcinoma de células escamosas invasivas, carcinoma de células grandes, leiomiomasarcoma, melanoma, melanoma maligno, tumor mesotelial maligno, meduloblastoma, meduloepitelioma, carcinoma mucoepidermoide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, osteosarcoma, adenocarcinoma seroso papilar, tumores pituitarios, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomiosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de tejidos blandos, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma no diferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrugoso, vipoma, tumor de Wilm. Aún más preferiblemente, el tumor/cáncer a ser tratado con los compuestos de la invención incluye cáncer intracerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer rectal, astrocitoma, preferiblemente astrocitoma de grado II, III o IV, glioblastoma, preferiblemente glioblastoma multiforme, cáncer de células pequeñas, y cáncer de células no pequeñas, preferiblemente cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma metastático, cáncer de próstata metastático independiente de andrógenos, cáncer de próstata metastático dependiente de andrógenos y cáncer de mama.

60 El término “arterioesclerosis” se refiere al ensanchamiento y endurecimiento de la pared arterial. Un tipo concreto de arterioesclerosis es la aterosclerosis que es la causa de la mayoría de las enfermedades de la arteria coronaria, de neurisma aórtico y de enfermedad arterial de las extremidades inferiores, y contribuye además a la enfermedad cerebrovascular. Una arteria normal presenta típicamente una parte interna (intima) constituida por una única capa de células endoteliales. Superpuesta a esta capa se encuentra la denominada capa media que contiene únicamente células de músculo blando. La capa externa, por su parte, es la adventicia. Con el envejecimiento, se produce un continuo aumento en la anchura de la intima, resultado en parte de la migración y proliferación de las células del músculo blando. Un aumento similar en la anchura de la intima ocurre también como resultado de varios episodios traumáticos

o intervenciones, tales como los que ocurren cuando un proceso de dilatación provoca el daño en la pared de los vasos. Los compuestos empleados en la presente invención son potencialmente útiles para inhibir la proliferación de células endoteliales, células del músculo blando y fibroblastos. En consecuencia, los compuestos diterpenoides de tipo labdano descritos en la invención también pueden emplearse para el tratamiento de condiciones arterioescleróticas.

5 Se entiende por “condiciones arterioescleróticas” aterosclerosis clásica, aterosclerosis acelerada y cualquier otra condición arterioesclerótica caracterizada por una indeseable proliferación de células endoteliales y/o del músculo blando vascular, incluyendo complicaciones vasculares de la diabetes y glomeruloesclerosis diabética.

10 Por el término “restenosis” se entiende aquella enfermedad que cursa con una proliferación y migración excesiva de células como resultado de la liberación de factores de crecimiento producidos por un daño mecánico de las células endoteliales que constituyen las arterias coronarias.

15 Por “enfermedad angiogénica” se entiende una enfermedad o condición médica que cursa con una neovascularización anormal. Tales enfermedades o condiciones incluyen retinopatía diabética, glaucoma neovascular, artritis reumatoide y algunos cánceres, tales como hemangioendoteliomas, hemangiomas y sarcoma de Kaposi. La proliferación de células endoteliales y de células del músculo blando vascular es la principal característica de la neovascularización. Los compuestos descritos en la presente invención son útiles para inhibir dicha proliferación y, en consecuencia, para inhibir la progresión de la condición angiogénica que depende totalmente o en parte de dicha neovascularización.

20 El término “fibrosis” se refiere a una formación o desarrollo excesivo de tejido fibroso conectivo en un órgano o tejido. Fibrosis incluye por ejemplo fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar idiopática, enfisema, fibrosis pulmonar (que conduce a una enfermedad pulmonar obstructiva crónica), enfermedad de Peyronie, escleroderma, enfermedad pulmonar parenquimal difusa, queloides, fibrosis mediastinal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis proliferativa, fibrosis neoplásica, fibrosis renal intersticial, fibrosis hepática, cicatrices quirúrgicas o quemaduras.

25 Por el término “enfermedades dermatológicas” se entiende enfermedades de la piel que cursan con proliferación celular asociada con cualquier disfunción proliferativa. Entre éstas se incluye, por ejemplo, queloides, escaras hipertróficas, queratosis seborreica, infección por el virus de papiloma, queratosis actínica y eczema.

30 Por el término “enfermedades inflamatorias” se entiende enfermedades que provocan inflamación como consecuencia de una proliferación celular asociada con cualquier disfunción proliferativa. Entre éstas se incluye, por ejemplo, glomerulonefritis proliferativa, lupus eritematoso, escleroderma, artritis temporal, tromboangitis y síndrome del nódulo linfático mucocutáneo.

35 Otro aspecto de la presente invención es un método para el tratamiento de una enfermedad o desorden asociado a una proliferación celular indeseada, que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente o una composición farmacéutica del mismo.

40 La enfermedad o desorden se selecciona preferiblemente entre, pero no se limita a, cáncer, restenosis, arterioesclerosis, enfermedades angiogénicas, fibrosis, enfermedades dermatológicas y enfermedades inflamatorias.

45 El término “tratamiento” o “tratar” en el contexto de esta especificación significa administración de un compuesto de formulación según la invención para prevenir, aliviar o eliminar la enfermedad o uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad. “Tratamiento” también abarca prevenir, aliviar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad. El término “aliviar” en el contexto de esta invención se entiende como significando cualquier mejora de la situación del paciente tratado- tanto subjetivamente/sentimiento del o sobre el paciente) como objetivamente (parámetros medidos).

50 En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento *in vitro* (en adelante primer método de la invención) para la inducción de apoptosis en una célula que comprende el poner en contacto dicha célula con un compuesto de la fórmula (I) en ausencia de LPS.

55 El término “apoptosis”, según se usa en la presente invención, se refiere a la muerte celular programada caracterizada por la pérdida de la asimetría de membrana, pérdida de la adhesión al sustrato, encogimiento celular, fragmentación nuclear, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN cromosómico.

60 El término “LPS” o lipopolisacárido, según se usa en la presente invención, se refiere a una preparación en cualquier grado de pureza del principal componente de la membrana externa de las bacterias gram-negativas formado por el polisacárido central, las cadenas laterales polisacáridicas conectadas al polisacárido central y una fracción lipídica denominada A.

65 La puesta en contacto de la célula con el compuesto de la fórmula (I) puede llevarse a cabo usando cualquier método conocido para el experto en la materia, incluyendo la puesta en contacto directa de la célula en la que se desea inducir apoptosis, estando dicha célula en cultivo, con el compuesto en un solvente adecuado para su acceso a sus diana celular, tales como DMSO y similares. En una forma preferida de realización, las células en las que se lleva a cabo el primer método de la invención son células que presentan en la superficie celular uno o varios tipos de receptores de muerte celular y que, por tanto, son capaces de sufrir apoptosis por la denominada vía extrínseca mediante la estimulación de dichos receptores por sus respectivos ligandos. Receptores de muerte celular que pueden ser usados

en el contexto de la presente invención incluyen Fas, TNF-R1 y TRAIL-R2 cuya activación por el ligando Fas en el caso de Fas, por TNF en el caso de TNF-R1 y por TRAIL en el caso de TRAIL-R2 (ligando de TRAIL) provoca la entrada de la célula en apoptosis por un mecanismo que implica la activación de caspasas a través de las proteínas de membrana TRADD y FADD y la subsiguiente muerte celular. En una forma aún más preferida de realización, el primer método de la invención se lleva a cabo sobre células RAW 264.7, células Jurkat o células HT-29.

Los autores de la presente invención han demostrado que la apoptosis en células tumorales inducida por los compuestos de fórmula (I) puede ser inhibida mediante el pretratamiento de dichas células con anticuerpos neutralizantes específicos para ligando de Fas, TNF-R1 y TRAIL-R2 (ejemplo 5) así como con el inhibidor de caspasa 8 IETD-CHO (ejemplo 4). Estos resultados abren la puerta para la puesta en práctica de métodos para la identificación de compuestos capaces de inhibir la apoptosis mediada por la activación de receptores muerte mediante. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la identificación de inhibidores de apoptosis que comprende

(i) poner en contacto una población celular con un compuesto de fórmula (I) según se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y de un compuesto candidato

(ii) determinar la tasa de apoptosis en la población celular

en donde una disminución de la tasa de apoptosis en dicha población celular en presencia del compuesto candidato con respecto a una población control es indicativa de que dicho compuesto es capaz de inhibir la apoptosis.

La primera etapa del segundo método de la invención comprende la puesta en contacto de la población celular con un compuesto de fórmula (I) y con un compuesto cuya actividad inhibidora de la apoptosis se quiere detectar. El experto en la materia apreciará que el método incluye la puesta en contacto de la célula con ambos compuestos de forma simultánea, con el agente candidato en primer lugar seguido del compuesto de fórmula (I) o con el compuesto de fórmula (I) en primer lugar seguido del compuesto candidato. Típicamente, las células son pretratadas con el compuesto candidato y posteriormente puestas en contacto con el compuesto de fórmula (I).

El tipo de sustancias que pueden ser ensayadas en el segundo procedimiento de la invención no está limitada. Así, la invención contempla el ensayo de ácidos nucleicos, péptidos, hidratos de carbono, polímeros, peptoides, moléculas de bajo peso molecular así como proteínas tales como anticuerpos, citoquinas y similares.

Por "poner en contacto" una célula con el compuesto candidato se incluye, según la presente invención, cualquier posible forma de llevar el compuesto candidato a la proximidad de su diana celular. Así, en caso de que el compuesto candidato sea una molécula de bajo peso molecular, es suficiente con añadir dicha molécula al medio de cultivo. En caso de que el compuesto candidato sea una molécula de alto peso molecular (por ejemplo, polímeros biológicos tales como un ácido nucleico o una proteína), es necesario aportar los medios para que esa molécula pueda acceder al interior celular. En caso de que la molécula candidata sea un ácido nucleico, pueden usarse métodos convencionales para transfección, según se ha descrito anteriormente para la introducción de la construcción de ADN. En caso de que el compuesto candidato sea una proteína, la célula puede ponerse en contacto tanto con la proteína directamente como con el ácido nucleico que la codifica acoplado a elementos que permitan su transcripción/traducción una vez que se encuentren en el interior celular. Para ello, se pueden usar cualquiera de los métodos de transfección conocidos para el experto en la materia (véase secciones 9.1 a 9.5 en Ausubel, F.M. *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc.). En particular, las células se pueden transfectar mediante co-precipitación de ADN con fosfato cálcico, DEAE-dextrano, polibreon, electroporación, microinyección, fusión mediada por liposomas, lipofección, infección por retrovirus y transfección biolística. Alternativamente, es posible poner en contacto la célula con una variante de la proteína que se desea estudiar que ha sido modificada con un péptido que sea capaz de promover la translocación de la proteína al interior celular, tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex y oligómeros de arginina (Lindgren, A. *et al.*, 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:99-103, Schwarze, S.R. *et al.*, 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:45-48, Lundberg, M *et al.*, 2003, *Mol. Therapy* 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, *Pharm. Res.* 21:389-393).

Preferiblemente, el compuesto a ensayar no se encuentra aislado sino que se encuentra formando parte de una mezcla más o menos compleja bien derivada de una fuente natural o bien formando parte de una biblioteca de compuestos. Ejemplos de bibliotecas de compuestos que pueden ser ensayadas según el método de la presente invención incluyen, sin limitación, bibliotecas de péptidos incluyendo tanto péptidos como análogos peptídicos que comprenden D-amino ácidos o péptidos que comprenden enlaces no peptídicos, bibliotecas de ácidos nucleicos incluyendo ácidos nucleicos con enlaces no fosfodiéster del tipo de fosforotioato o ácidos nucleicos peptídicos, bibliotecas de anticuerpos, de carbohidratos, de compuestos de bajo peso molecular, preferiblemente moléculas orgánicas, de peptidomiméticos, y similares. En el caso de que se use una biblioteca de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, la biblioteca puede haber sido preseleccionada para que contengan compuestos que puedan acceder al interior celular con mayor facilidad. Así, los compuestos se pueden seleccionar en base a determinados parámetros tales como tamaño, lipofilicidad, hidrofiliicidad, capacidad de formar puentes de hidrógeno.

Alternativamente, los compuestos a ensayar pueden estar formando parte de un extracto obtenido de una fuente natural. La fuente natural puede ser animal, vegetal obtenido de cualquier entorno, incluyendo, sin limitación, extractos de organismos terrestres, aéreos, marinos y similares.

ES 2 333 836 A1

En una forma preferida de realización, el segundo método de la invención se lleva a cabo usando una célula que exprese en su superficie uno o más tipos de receptores de muerte celular. En una forma aún más preferida de realización, dichos receptores de muerte celular se selecciona del grupo de Fas, TNF-R1 y TRAIL-R2. En una forma aún más preferida de realización, el método de acuerdo a la invención se lleva a cabo usando una célula seleccionada del grupo de una célula RAW 264.7, una célula Jurkat y una célula HT-29.

La segunda etapa del segundo procedimiento de la invención comprende detectar la aparición de apoptosis en la población celular objeto de estudio. Ejemplos de métodos adecuados para la detección de la tasa de apoptosis en una población celular incluyen, sin limitación:

- (i) la determinación del grado de fragmentación del ADN a nivel de las regiones internucleosomales. Típicamente, este método comprende la extracción de ADN, su procesamiento, separación según su tamaño y la posterior cuantificación de ADN intacto y fragmentado.
- (ii) Criterios morfológicos basados en la detección de células que muestran un menor tamaño celular y los núcleos aparecen condensados y fragmentados,
- (iii) Marcaje de ADN mediante el uso de la deoxinucleotidil transferasa terminal en presencia de análogos marcados de nucleótidos (típicamente timidina tritiada o bromodeoxiuridina) que permite detectar las células apoptóticas ya que emiten una señal muy intensa en comparación con células no apoptóticas. (Waldman *et al.*, 1991, *Modern Pathol.* 4:718-722; Gratzner, 1982, *Science* 218:474-475).
- (iv) Detección del procesamiento de poli (ADP-ribosa) polimerasa mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos,
- (v) Detección de la activación de CCP32/Caspasa-3 mediante el uso de kits fluorescentes y calorimétricos,
- (vi) Detección de la activación de caspasa tales como el kit fluorescente FLICE/caspase-8 (Clontech Laboratories, Inc.).
- (vii) Ensayos basados en la detección de la traslocación de fosfatidilserina mediante marcaje con anexina V,
- (viii) Citometría de flujo mediante marcaje con yoduro de propidio,
- (ix) Determinación de cambios en la expresión génica de genes asociados a la apoptosis tales como los incluidos en Human Apoptosis RT2 Profiler PCR Array (descritos en <http://www.biomol.de/details/SA/DS/PAHS-3012E.pdf>),
- (x) determinando la formación postraducciona de enlaces isodipetídicos $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})$ lisina (Patente en los EEUU número US5750360).

Finalmente, la tasa de apoptosis en la población celular en presencia del compuesto de fórmula (I) y del compuesto candidato se compara con la tasa de apoptosis en una población celular control. Típicamente, la población celular control corresponde a células del mismo tipo que las usadas para ensayar el compuesto candidato pero que han sido incubadas únicamente con el compuesto de fórmula (I) y, preferiblemente, el solvente o vehículo en el que se encuentra el compuesto candidato. Aquellos compuestos que provoquen una disminución de la tasa de apoptosis con respecto a la población control son potencialmente compuestos capaces de inhibir la apoptosis. El experto en la materia apreciará que la tasa de apoptosis se definirá de manera distinta según el tipo de método usado para detectar la apoptosis. Así, si la apoptosis se detecta mediante inspección morfológica de las células, esta se medirá como el porcentaje de células que entran en apoptosis. Si la determinación se lleva a cabo en extractos totales, la tasa de apoptosis se determinará como un número de unidades arbitrarias normalizado por el número de células usadas para preparar el extracto. Preferiblemente, la tasa de apoptosis en la población celular tratada con el compuesto candidato se define por referencia a la tasa de apoptosis en la población control. En ese caso, se entiende que se ha producido una disminución en la tasa de apoptosis en la población celular tratada con el compuesto candidato si esta muestra una disminución de al menos 1%, al menos 2%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 100%, esto es, que no se detecta ninguna célula en apoptosis.

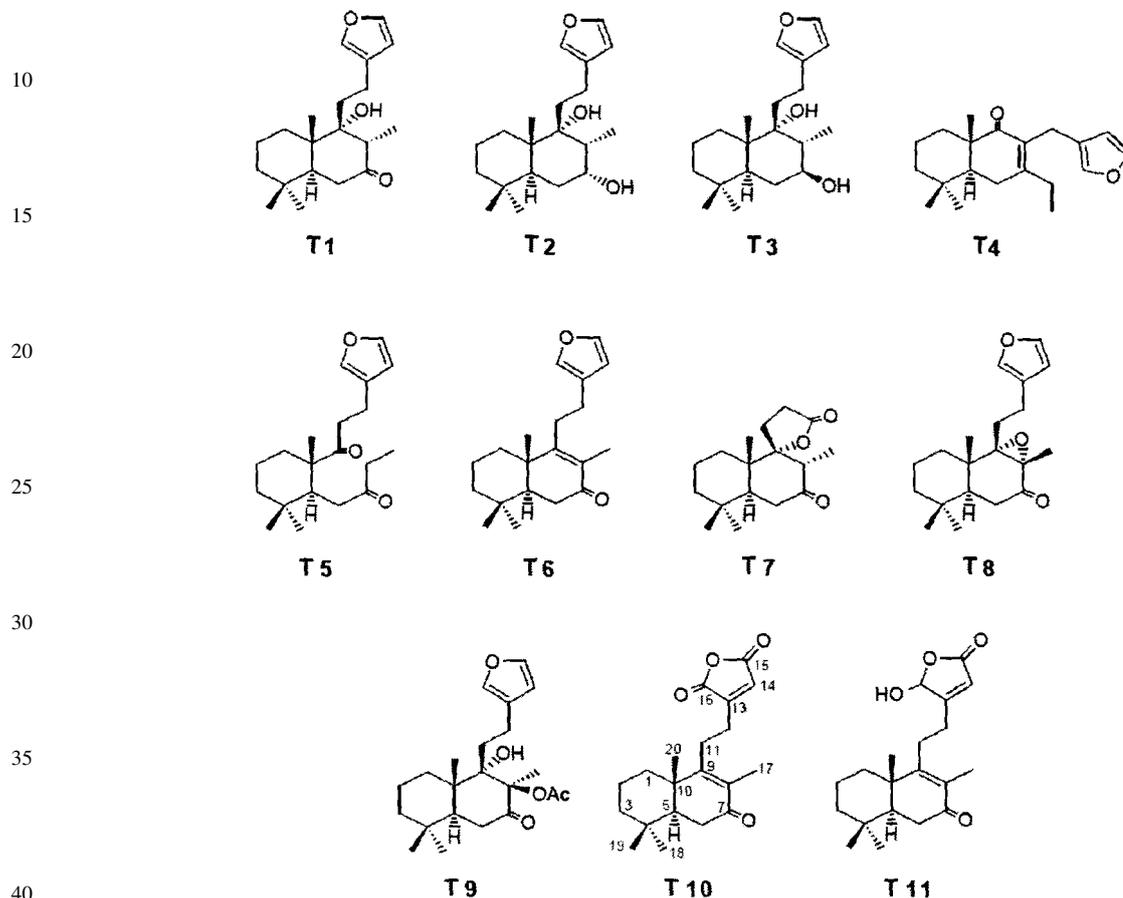
El método descrito en la presente invención puede ser llevado a cabo usando métodos de alta capacidad de procesamiento (high throughput Screening) usando métodos de sobra conocidos en el estado de la técnica.

A continuación, la presente invención se explica adicionalmente mediante ejemplos. En ningún caso deberá ser interpretado como una limitación del ámbito de la invención tal y como se define en las reivindicaciones.

Ejemplos

Materiales y métodos

5 Los compuestos diterpenoides empleados en los diferentes ejemplos se muestran en el siguiente esquema:



45 El compuesto T1 y el compuesto T9 se han obtenido según el procedimiento descrito por Savona *et al.* en *Heterocycles*, 1978, 9, 257-261 y Rodríguez B, Savona G. Diterpenoids from *Galeopsis Angustifolia*. *Phytochemistry* 1980; 19:1805-1807, respectivamente. Por su parte, los compuestos T2-T8 y T11 se han sintetizado siguiendo el procedimiento descrito en *Anales de Química*, 1981, 77, 316-319; 324-329 y 330-334, mientras que el T10 se sintetizó a partir del compuesto T6 según el procedimiento descrito por Giron *et al.*, *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;

50 Los reactivos empleados para el Western blot (membranas de difluoruro de polivinilo y kit ECL) fueron suministradas por GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Los anticuerpos proceden de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Cell Signaling (Beverly, MA) y R&D Systems (Minneapolis, MN). Las sondas fluorescentes para determinar la actividad de caspasa proceden de BD Biosciences (San Diego, CA) y CaspGlow es de BioVision (Mountain View, CA). Los medios de cultivo fueron suministrados por Bio Whittaker (Verviers, Bélgica). Los concentrados de ligandos, incluyendo los terpenoides, se disolvieron en DMSO y a continuación se diluyeron en PBS antes de su uso.
55 El array para PCR RT2 Profiler™ fue suministrado por SuperArray (Frederick, MD).

Condiciones del medio de cultivo

60 La línea celular de tipo macrofágico RAW 264.7 de origen murino que fue establecida a partir de un tumor inducido en una hembra de ratón por inyección intraperitoneal del virus de la leucemia Abelson (A-MuLV) fue mantenida en un medio RPMI 1640 suplementado con SFB (suero fetal bovino) al 10%, L-glutamina y antibióticos.

65 Para los experimentos de medida de la viabilidad celular se utilizaron células de la línea RAW 264.7 descrita anteriormente así como células de la línea tumoral humana Jurkat establecidas a partir de un linfoma de células T y las células HT-29, establecidas a partir de un adenocarcinoma de colon. Las células Jurkat se mantuvieron en las mismas condiciones que las células RAW 264.7, mientras que las células HT-29 se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% FBS y antibióticos (50 µg/ml de penicilina y estreptomina) a 37°C y 5% O₂

ES 2 333 836 A1

Preparación de macrófagos peritoneales estimulados

Ratones mantenidos libres de patógenos fueron inyectados intraperitonealmente con 1 mL de tioglicolato estéril al 10%. Transcurridos 4 días, se prepararon macrófagos peritoneales tal como se describe en *J. Immunol.*, 2006, 177 (5), 3327-3336. Brevemente, animales anestesiados con CO₂ fueron inyectados intraperitonealmente con 10 mL de DMEM estéril. El fluido peritoneal se aspiró con cuidado para evitar hemorragia y se mantuvo a 4°C para prevenir de la adhesión de los macrófagos al plástico. Las células se centrifugaron a 200 g durante 10 min. a 4°C, y el sedimento de células se lavó dos veces con 45 mL de PBS en frío. Las células se sembraron a 1 x 10⁶/cm² en medio RPMI que contiene SFB al 10%. Las células no adheridas se eliminaron 4 horas después de la siembra mediante lavado abundante con el medio.

Análisis de la apoptosis y necrosis por citometría de flujo

Tras el tratamiento con el estímulo apropiado, las células se tiñeron con yoduro de propidio (IP) al 0.005% en peso/volumen e inmediatamente se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson) según el protocolo previamente descrito en *Cell Death Differ* 2002, 9:643-650. Los porcentajes de células apoptóticas y necróticas se determinaron a partir del gráfico de dispersión frontal frente a fluorescencia de IP tal como se describe en *J. Clin. Invest.*, 1995, 95:1884-1890 y *Mol. Pharmacol.* 1997, 51:414-421.

Preparación de los extractos citosólicos

Las células se lavaron dos veces con tampón frío A (10 mM Hepes, pH 7.9, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinina, 10 µg/mL leupeptina, 2 µg/mL TLCK, 5 mM NaF, 1 mM NaVO₄, 10 mM Na₂MoO₄) y se eliminaron de las placas mediante recogida. Las células se lisaron a 4°C con 0.2 mL de tampón suplementado con Nonidet P-40 al 0.5% bajo continua agitación. Después de la centrifugación (8000 x g; 15 min.) del lisado celular el sobrenadante se almacenó a -80°C (extracto citosólico). El contenido en proteína fue estimado mediante el ensayo de proteínas Bio-Rad. Todas las etapas de fraccionamiento de células se realizaron a 4°C.

Western blot

Los extractos de proteína se separaron por tamaño mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno que estaban incubadas con los siguientes anticuerpos: anti-β-actina, anti-Bid, anti-Bcl-x1, anti Bcl-2 (todos procedentes de Santa Cruz Biotechnology) y anti-citocromo c (BD Biosciences). Tras la incubación con anticuerpo secundario conjugado con HRP, las bandas de proteína se revelaron con el kit de quimioluminiscencia mejorada (GE Healthcare). Las membranas que contienen las proteínas transferidas son secuencialmente re-marcadas con anticuerpos, tras el tratamiento con 10 mM de β-mercaptoetanol y 2% de SDS en TBS durante 30 min. a 60°C. La β-actina se utilizó como control de carga.

Evaluación de la despolarización mitocondrial

Con el fin de detectar los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), las células estimuladas con los diterpenoides se separaron y tiñeron con éster metílico de tetrametilrodamina (TMRE; Molecular Probes), un colorante fluorocromo lipofílico catiónico que selectivamente tiñe mitocondrias con un gradiente electroquímico intacto, durante 30 min. a 37°C. Las células se analizaron mediante fluorescencia TMRE en un citómetro de flujo FACSCanto II.

Ensayos de caspasa

Las actividades de caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9 se determinaron fluorométricamente en los extractos de proteína citosólica, empleando los sustratos Ac-DEVD-AMC, Ac-IETD-AMC y Ac-LEHD-AMC, respectivamente, según las instrucciones del suministrador (BD Biosciences). De forma alternativa, la actividad de caspasa 8 se midió mediante citometría de flujo de células vivas, utilizando el kit de caspasa 8 Fluoresceína CaspGLOW™ según las instrucciones del suministrador (Bio Vision).

Perfil de expresión génica

Se extrajo el RNA total de las células tratadas con diterpenoides con el reactivo Trizol (Life Technologies, Inc.). La expresión de los genes apoptóticos se evaluó con el array para PCR RT2 Profiler, que comprende 86 genes relacionados con muerte celular (Super Array). Brevemente, el RNA total (1 µg) se sometió a una transcripción inversa con hexámeros aleatorios (kit de reactivo de transcripción inversa Taqman, Applied Biosystems, Foster City, CA). El molde se añadió a una mezcla maestra preparada para usar RT2 Real-Time™ SYBR Green PCR, según el protocolo del proveedor, y se repartieron alícuotas de la mezcla a los pocillos de la placa, en las que se habían dispensado conjuntos de cebadores específicos para cada gen. Los parámetros termocíclicos de PCR fueron 95°C durante 10 min., 40 ciclos de 95°C durante 15 s, y 60°C durante 1 min. Las matrices se analizaron con un detector de secuencias ABI 7900 (Applied Biosystems), y la expresión relativa se determinó mediante el método $\Delta\Delta Ct$.

ES 2 333 836 A1

Tratamiento de las células con anticuerpos neutralizantes contra receptores de la muerte

Las células se pretrataron con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpos neutralizantes específicos para el ligando de Fas, y los receptores de TNF-R1 o los dominios extracelulares de TRAIL-R2 (R&D Systems, Minneapolis, MN), tanto separadamente como en combinación, durante 1 hora antes de la estimulación durante 6 horas con 25 μM del diterpenoide seleccionado.

Determinación de NO, O_2^- y H_2O_2

La liberación de NO se determinó espectrofotométricamente a partir de la acumulación de nitritos en fenol mediante reacción de Griess, tal como se describe en *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2008, 228, 179-189. La absorbancia a 548 nm del medio condicionado se comparó con el de las soluciones estándar de NaNO_2 .

Para la determinación de la producción de O_2^- y H_2O_2 , las células estimuladas con los diterpenoides se incubaron durante 15 min. con 10 μM de hidroetidina (HE) o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH); las señales fluorescentes correspondientes a las sondas oxidadas se detectaron mediante citometría de flujo tal como se describe en *J. Immunol.* 2000, 165(11), 6525-6531.

Análisis estadístico

Los datos presentados se muestran como media \pm desviación estándar (D.S.) de tres experimentos independientes. La significancia estadística se estimó mediante el test *t* de Student para observaciones alternas con $P < 0.05$ considerado como significativo. En los estudios de Western blot, se observó una correlación lineal entre las cantidades incrementadas de proteína y la intensidad de la señal.

Ejemplo 1

Inducción de apoptosis en líneas celulares tumorales por diterpenoides derivados de labdano

Los diterpenoides derivados de labdano seleccionados para este estudio son los diterpenoides naturales hispanolona (T1) y galeopsina (T9) y otros 9 derivados de hispanolona (T2-T8, T10 y T11). Con el fin de investigar el potencial apoptótico de estos compuestos, células RAW 264.7 se trataron durante 24 horas con un rango de concentraciones desde 1 hasta 100 μM (Figura 1). Los compuestos T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8 y T11 fueron capaces de inducir apoptosis (medida por tinción con yoduro de propidio), sin embargo, no se detectó apoptosis con los compuestos T7, T9 y T10 incluso a altas concentraciones. Los compuestos más eficaces fueron T2 y T6, que indujeron apoptosis, respectivamente, en un 33.5% y 46.4% de células a una concentración de 10 μM , y 88.2% y 92.8% de células a 25 μM . Dada su elevada acción apoptótica, el compuesto T6 ha sido el compuesto principalmente ensayado en los siguientes experimentos. Cuando así se indica, el compuesto T7 se ha utilizado como control negativo.

Con el fin de comparar el efecto pro-apoptótico de los terpenos conocidos en el estado de la técnica (andrografolido) y de los compuestos de la invención se llevaron a cabo experimentos en tres tipos de líneas celulares inmortalizadas obtenidas de la ATCC. En concreto, se utilizaron la línea de tipo macrofágico RAW 264.7 de origen murino que fue establecida a partir de un tumor inducido en una hembra de ratón por inyección intraperitoneal del virus de la leucemia Abelson (A-MuLV), y dos líneas tumorales humanas, las células Jurkat establecidas a partir de un linfoma de células T y las células HT-29 a partir de un adenocarcinoma de colón.

Las células RAW 264.7 y Jurkat se mantuvieron en medio RPMI mientras que las células HT-29 en medio DMEM, ambos suplementado con 10% FBS y antibióticos (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de penicilina y estreptomycin) a 37°C y 5% O_2 . Para los experimentos las células se sembraron a una densidad de $0.8 \cdot 10^5/\text{cm}^2$ en presencia de diferentes concentraciones (1, 2, 5, 10, 25, 50 y 100 μM) de los terpenos objeto de la patente (compuesto T2 y T6) y del andrografolido. Tras 24 horas de incubación, se procedió a la determinación del porcentaje de apoptosis mediante técnicas de citometría de flujo. Las células se incubaron en presencia de 0.005% de yoduro de propidio (Giron *et al* 2008), analizándose en citómetro de flujo Cyan MLE-R (DAKO-Cytomation). La apoptosis se definió por la disminución en el tamaño celular y el aumento en la incorporación del colorante nuclear.

La figura 2 muestra que el andrografolido es menos efectivo que el T2 en la inducción de muerte. La IC_{50} en los tres tipos celulares para ambos compuestos se muestra en la tabla siguiente:

| | RAW 264.7 | JURKAT | HT-29 |
|--------------|------------------|------------------|---------------------|
| Andro | 95 μM | 35 μM | > 100 μM |
| T2 | 20 μM | 15 μM | 32 μM |

Con el fin de descartar una posible inducción de necrosis, se ha medido la liberación de LDH tras el tratamiento con T6 y T7. Ningún compuesto indujo necrosis en macrófagos en todo el rango de concentraciones estudiado (figura 3). El tratamiento con T6 redujo el número de células viables de forma dependiente de la concentración, como se deduce de la medida de citometría de flujo tras la tinción con yoduro de propidio. La viabilidad celular no se vio afectada por el tratamiento con T7.

Ejemplo 2

10 *Expresión de genes relacionados con apoptosis en macrófagos tratados con diterpenoides derivados de labdano*

Con el fin de identificar genes expresados diferencialmente en macrófagos en respuesta a los diterpenoides de tipo labdano, las células se trataron con el compuesto T6 (25 μ M, durante 2, 4 y 8 horas), y el ARN procedente de las células tratadas y control fue hibridado a un Array de PCR RT2 Profiler™. Los genes que exhibieron una diferencia en su expresión de dos veces o mayor se consideraron como sensibles al compuesto T6. Empleando estos criterios, se identificó un aumento significativo de la expresión de un grupo de genes transductores de señal involucrados en la inducción de apoptosis a través del mecanismo de los receptores de muerte, incluyendo TNF-R1, TRAIL-R2, Fas y CD40 (Figura 4). Además, la expresión de miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 tales como Bak, Bid y Bax se vio incrementada, mientras que en los miembros anti-apoptóticos tales como Bcl-2 y Bcl-x1 se vio disminuida (Figura 4).

Ejemplo 3

25 *Inducción de la actividad de la caspasa 8 y del mecanismo mitocondrial por los diterpenoides derivados de labdano*

Dado que se ha demostrado que el compuesto T6 provoca el aumento de la expresión de los ARN que codifican los receptores de muerte, el siguiente paso ha sido investigar su capacidad para regular otros episodios en la señal de apoptosis, tal como la activación de caspasa y la señal mitocondrial. El tratamiento de las células RAW 246.7 con el compuesto T6 indujo la activación de caspasa 8, determinada fluorométricamente utilizando Ac-IETD-AMC como sustrato fluorogénico (Figura 5A). Además, los otros diterpenoides proapoptóticos (1, 2, 3, 4, 5, 8 y 11) fueron también capaces de inducir la activación de caspasa 8 (Figura 6).

La caspasa 8 activa puede inducir a su vez el mecanismo apoptótico mitocondrial mediante el procesamiento de Bid, cuya forma truncada activa la liberación del citocromo c de la mitocondria. Con el fin de determinar si T6 altera la señal mitocondrial, se monitorizó el potencial mitocondrial transmembrana ($\Delta\Psi_m$), una medida de la permeabilidad del orgánulo. Las células RAW 246.7 se trataron con T6 o T7 y se midieron los cambios en $\Delta\Psi_m$ tras tinción con el éster metílico de la tetrametil rodamina (TMRM). Como se muestra en la figura 5B, el compuesto T6 induce un colapso en $\Delta\Psi_m$ mientras que el compuesto T7 no provoca ningún efecto. Como control positivo de los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial, se utilizó el agente desacoplante m-CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone). El potencial de Bid en la apoptosis inducida por T6 se registró mediante Western-blot; el tratamiento de las células RAW 246.7 con 25 μ M de T6 indujo la escisión de Bid de forma dependiente con el tiempo (figura 5C); T7 no provocó ningún efecto. Además, los datos de Western blot confirmaron la reducción en la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x1 (figura 5C). La activación de Bid inducida por T6 y la despolarización de la membrana mitocondrial estaban acompañadas por el incremento en el citocromo c citosólico (figura 5C) y en las actividades enzimáticas de las caspasas 9 y 3 (figuras 5D, 5E). Como en el caso de la caspasa 8, las caspasas 9 y 3 fueron activadas de forma similar por los otros diterpenoides proapoptóticos (figuras 7 y 8). Estos datos demuestran, por tanto, que los diterpenoides seleccionados inducen apoptosis vía activación de caspasa 8, que activa a su vez el mecanismo extrínseco e induce también los episodios apoptóticos mitocondriales a través de la escisión de Bid.

Ejemplo 4

55 *Prevención de la apoptosis inducida por diterpenoides por inhibición de la caspasa 8*

Con el fin de confirmar el papel principal de la actividad de la caspasa 8 en la inducción de apoptosis por parte de los diterpenoides de la invención, se evaluó la capacidad del inhibidor IETD-CHO de la caspasa 8 para bloquear su efecto (figura 9^a). El pretratamiento de las células con IETD-CHO también inhibió la activación del mecanismo apoptótico mitocondrial, incluyendo el procesamiento de Bid, la reducción en la expresión de Bcl-2 y Bcl-x1, y la liberación del citocromo c de la mitocondria (figura 9C). También se previno el colapso del $\Delta\Psi_m$ (figura 9D), existiendo, por tanto, un bloqueo de la activación de los efectores posteriores caspasas 9 y 3 (figuras 9E, 9F).

65

Ejemplo 5

Bloqueo de la apoptosis inducida por los diterpenoides de tipo labdano mediante los anticuerpos neutralizantes contra el ligando de Fas y los receptores de muerte, TNF-R1 y TRAIL-R2

5 La caspasa 8 es una enzima iniciadora del mecanismo apoptótico de los receptores de muerte. Debido a la expresión aumentada de los receptores de muerte TNF-R1, Fas y TRAIL-R2 tras exposición con los diterpenoides (figura 4), se evaluó el papel potencial de estos receptores en la inducción de apoptosis. El pretratamiento con anticuerpos neutralizantes contra ligando de Fas, y los receptores TRAIL-R2 y TNF-R1 inhibió la apoptosis inducida por T6 en un 66.35%, 60.28% y 43.35%, respectivamente; y una combinación de los tres anticuerpos previno completamente la apoptosis inducida por diterpenoides (figura 10A). Mediante microscopía se corroboraron los resultados por tinción con yoduro de propidio, revelando la inhibición de los cambios morfológicos típicos de apoptosis (figura 10B). Los anticuerpos neutralizantes también inhibieron la actividad caspasa 8 (figura 10C) así como el procesamiento de Bid y la reducción de los niveles de Bcl-2 (figura 10D), confirmando que la apoptosis inducida por diterpenoides en macrófagos se inicia vía activación de los receptores de muerte.

Ejemplo 6

20 *Confirmación de que las especies reactivas de oxígeno no están involucradas en la apoptosis inducida por diterpenoides de tipo labdano*

Otro activador potencial de apoptosis en respuesta a los diterpenoides de tipo labdano es la producción y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Ni el compuesto T6 ni el T7 indujeron liberación de NO de células RAW 264.7 (figura 11A), y ningún compuesto incrementó la síntesis de O_2^- , medida por oxidación de hidroetidina (HE) (figura 11B). Por el contrario, T6 indujo un pronunciado aumento en la producción de H_2O_2 , como revela la oxidación del diacetato 5,6-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (figuras 11C, 11E). Sin embargo, aunque la preincubación de las células con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) inhibió la producción de ROS inducidas por T6, no previno la apoptosis inducida por T6 (figuras 11D, 11F). Estos resultados sugieren, por tanto, que la acción apoptótica de T6 en macrófagos es independiente de la producción de radicales libres.

Ejemplo 7

35 *Inducción de apoptosis por los diterpenoides derivados de labdano en macrófagos peritoneales*

Con el fin de examinar los efectos del compuesto T6 en un sistema más fisiológico, se han realizado experimentos en un cultivo primario de macrófagos peritoneales obtenidos de ratones inyectados con tioglicolato. Los macrófagos peritoneales fueron estimulados durante 24 horas con concentraciones diferentes de T6 o T7, y se determinó la apoptosis y la activación de caspasas (figura 12). El compuesto T6 indujo apoptosis de forma efectiva (figura 12A) y activó la caspasa 8 (figura 12B), caspasa 9 (figura 12C) y caspasa 3 (figura 12D) de forma similar a la observada en células RAW 264.7. Sin embargo, se requirieron dosis más elevadas para conseguir el mismo porcentaje de células apoptóticas en los cultivos celulares primarios. Estos datos sugieren que las células transformadas pueden ser más susceptibles a la apoptosis que las células no-transformadas, proporcionando evidencias para el posible uso de los diterpenoides de labdano como agentes antitumorales.

50

55

60

65

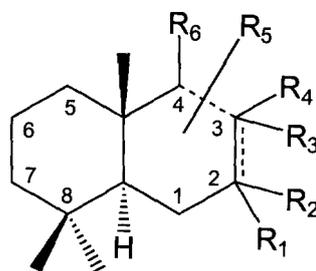
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):

5

10

15



(I)

20 donde:

----- significa ausencia de enlace, un enlace sencillo o un enlace doble;

25

===== significa un enlace sencillo o un enlace doble;

con la condición de que ambos no pueden ser a la vez un doble enlace;

R₁ y R₂ son independientemente, hidrógeno, hidroxilo, un grupo alquilo C₁-C₆ o juntos forman un grupo =O, con la condición de que uno de ellos no existe cuando ===== es un doble enlace;

30

R₃ es un grupo alquilo C₁-C₆ con la condición de que R₃ no existe cuando ===== es un doble enlace y el radical R₅ está ubicado en posición 3;

35

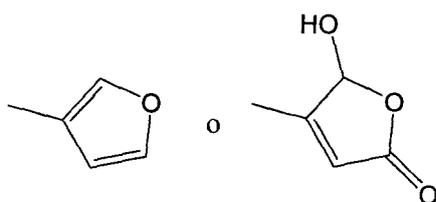
R₄ es hidrógeno o puede formar junto con R₆ un grupo epoxi cuando ----- es un enlace sencillo; con la condición de que R₄ no existe cuando ===== es un doble enlace;

R₆ es hidroxilo o un grupo =O cuando ----- significa ausencia de enlace, o puede formar junto con R₄ un grupo epoxi cuando ----- es un enlace sencillo; con la condición de que R₆ no existe cuando ----- es un enlace doble y el radical R₅ está ubicado en la posición 4;

40

R₅ es un grupo -(CH₂)₁₋₄-R₇ ubicado en la posición 3 ó 4, donde R₇ es:

45



50

o una sal, solvato o isómero farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a una proliferación celular indeseada.

55

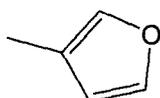
2. Compuesto según reivindicación 1, donde R₁ es hidroxilo o forma junto con R₂ un grupo =O.

3. Compuesto según reivindicaciones 1 ó 2, donde R₅ es un grupo -(CH₂)₂-R₇ ubicado en la posición 4.

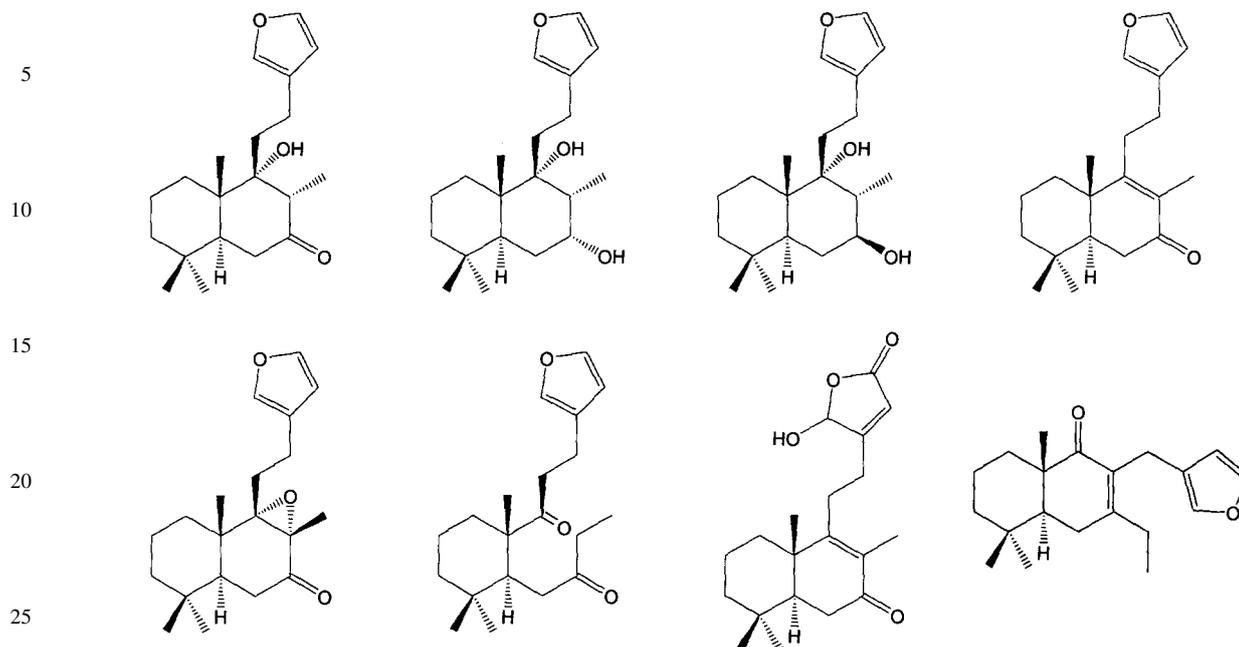
60

4. Compuesto según reivindicación 3, donde R₇ es:

65



5. Compuesto según reivindicación 1 seleccionado entre los siguientes compuestos:



6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la enfermedad asociada a una proliferación celular indeseada se selecciona entre cáncer, restinosis, arterioesclerosis, enfermedades angiogénicas, fibrosis, enfermedades dermatológicas y enfermedades inflamatorias.

7. Compuesto según reivindicación 6, donde el cáncer se selecciona entre cáncer de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza, cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos e hígado.

8. Compuesto según reivindicación 6, donde las enfermedades angiogénicas se seleccionan entre retinopatía diabética, glaucoma neovascular y artritis reumatoide.

9. Compuesto según reivindicación 6, donde las enfermedades dermatológicas se seleccionan entre queloides, escaras hipertróficas, queratosis seborreica, infección por el virus de papiloma, queratosis actínica y eczema.

10. Compuesto según reivindicación 6, donde las enfermedades inflamatorias se seleccionan entre glomerulonefritis proliferativa, lupus eritematoso, escleroderma, artritis temporal, tromboangitis y síndrome del nódulo linfático mucocutáneo.

11. Un procedimiento *in vitro* para inducir apoptosis en una célula que comprende poner en contacto dicha célula con un compuesto de fórmula (I) como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en ausencia del lipopolisacárido LPS.

12. Procedimiento según la reivindicación 11 en donde dicha célula expresa en su superficie uno o más tipos de receptores de muerte celular.

13. Procedimiento según la reivindicación 12 en donde dicho receptor de muerte celular se selecciona del grupo de Fas, TNF-R1 y TRAIL.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 en el que la célula se selecciona del grupo de una célula RAW 264.7, una célula Jurkat y una célula HT-29.

15. Un procedimiento para la identificación de inhibidores de apoptosis que comprende

(i) poner en contacto una población celular con un compuesto de fórmula (I) según se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y de un compuesto candidato

(ii) determinar la tasa de apoptosis en la población celular

en donde una disminución de la tasa de apoptosis en dicha población celular en presencia del compuesto candidato con respecto a una población control es indicativa de que dicho compuesto es capaz de inhibir la apoptosis.

ES 2 333 836 A1

16. Procedimiento según la reivindicación 15 en donde dicha célula expresa en su superficie uno o más tipos de receptores de muerte celular.

5 17. Procedimiento según la reivindicación 16 en donde dicho receptor de muerte celular se selecciona del grupo de Fas, TNF-R1 y TRAIL.

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 en el que la células se selecciona del grupo de una célula RAW 264.7, una célula Jurkat y una célula HT-29.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

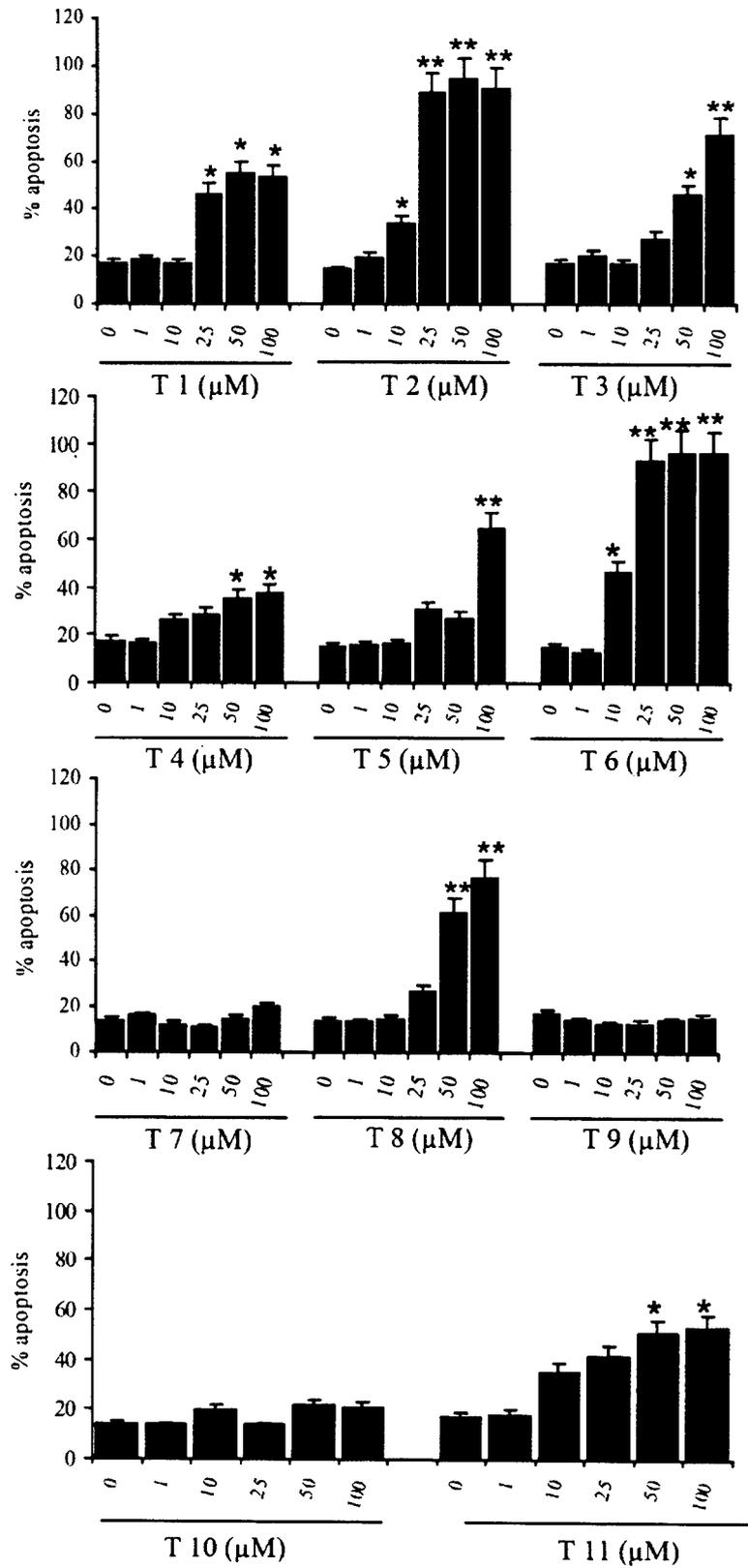


Figura 1

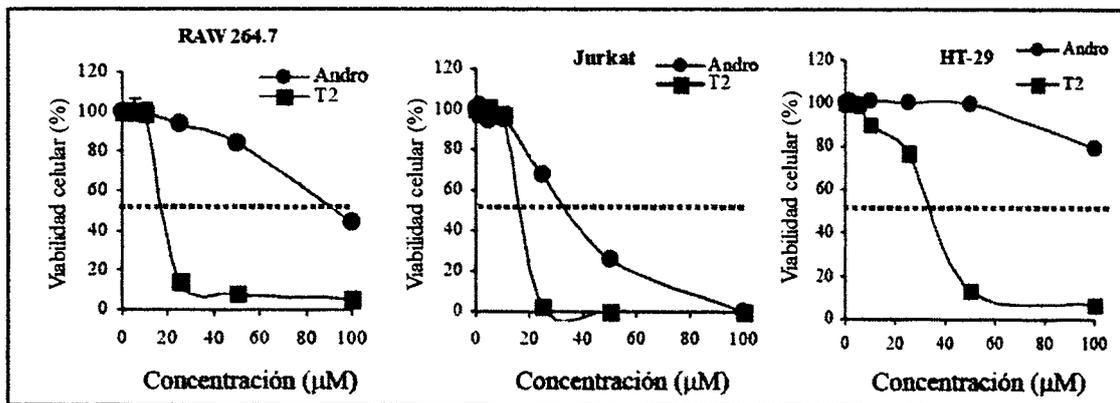


Figura 2

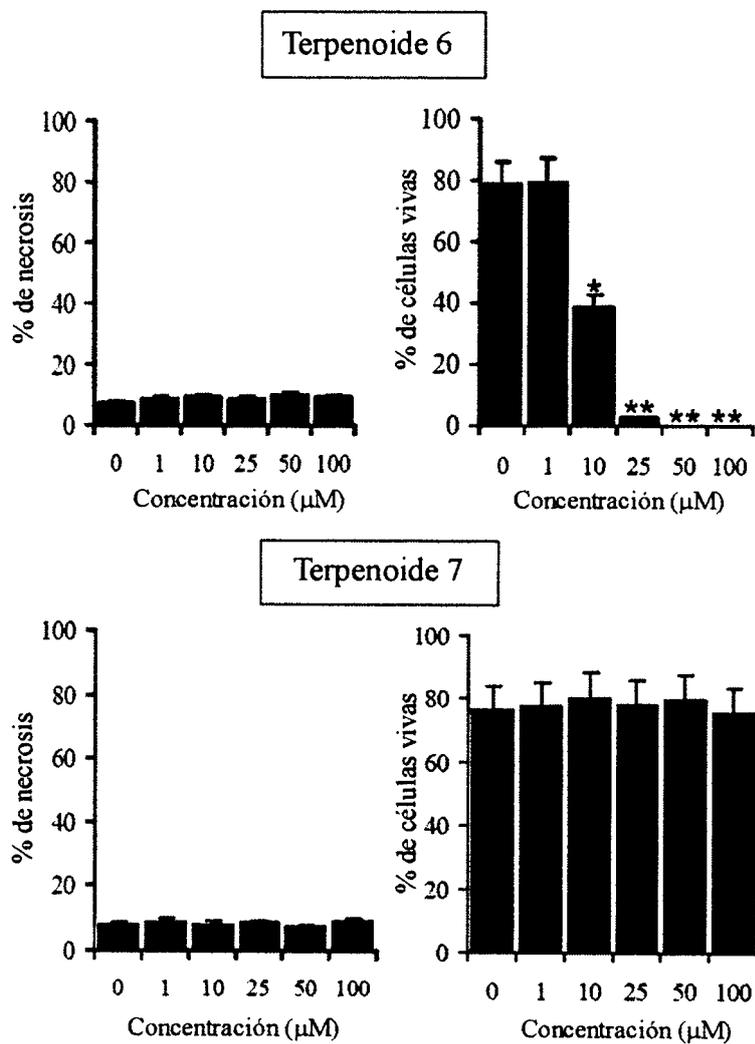


Figura 3

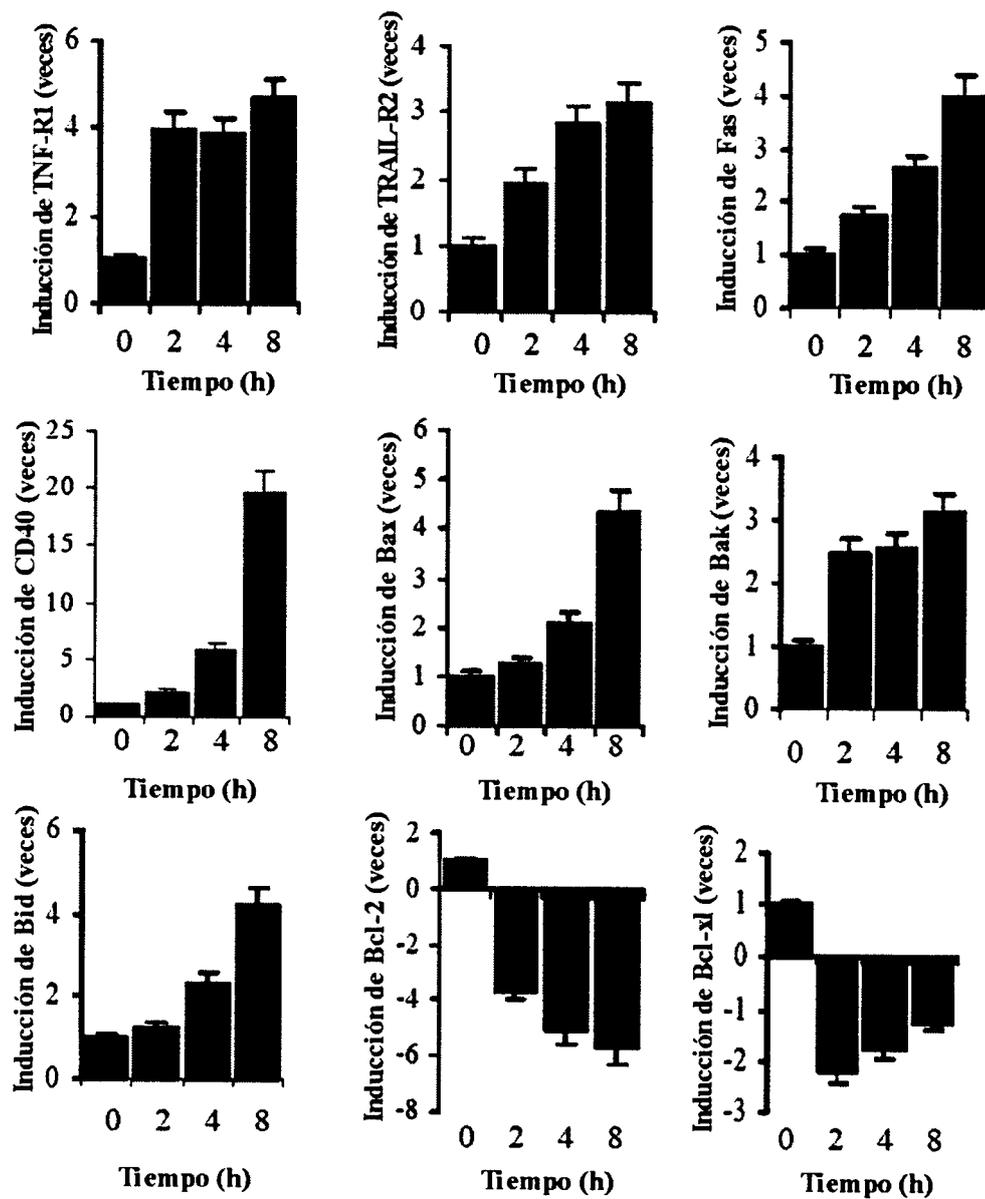


Figura 4

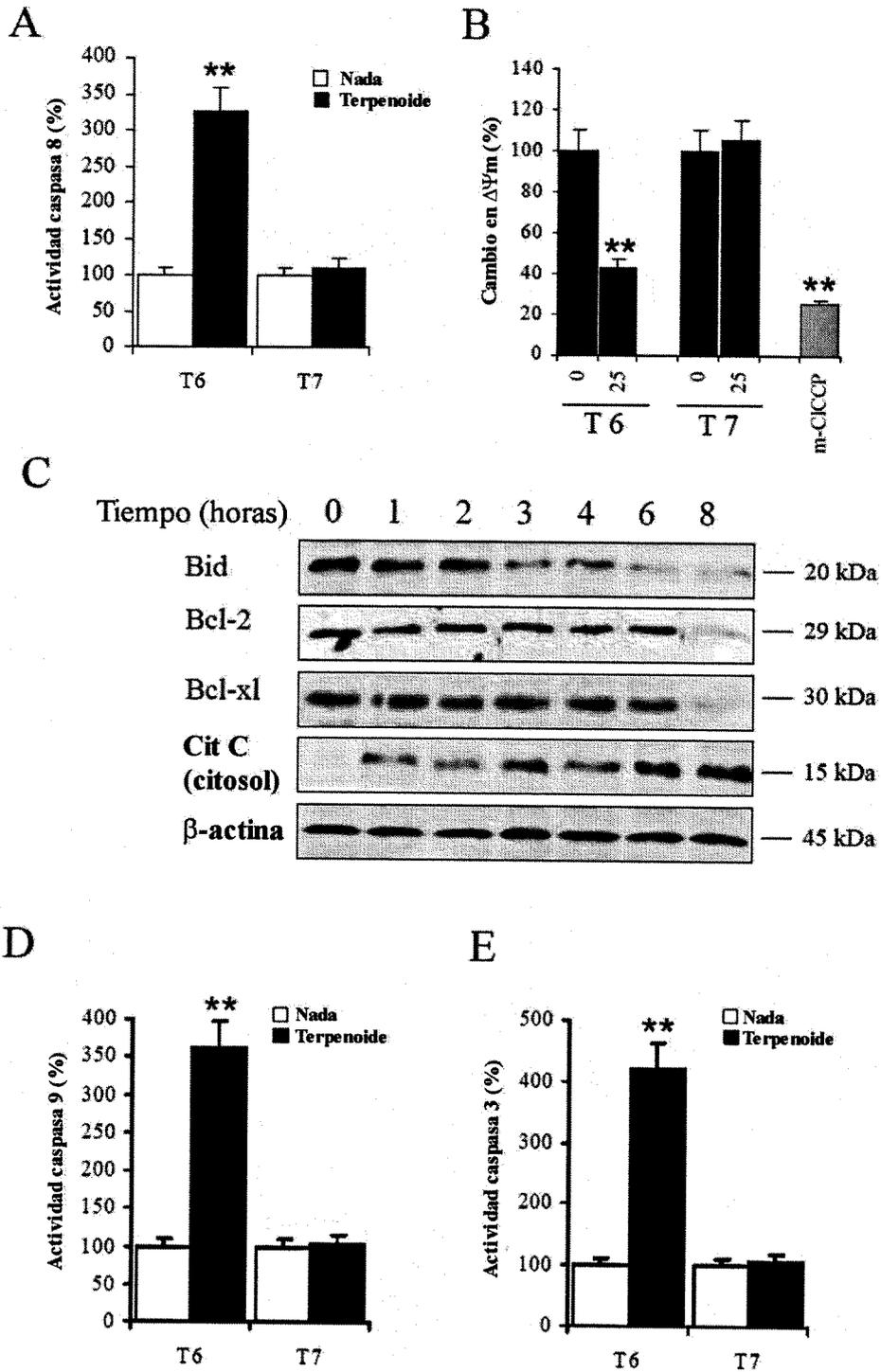


Figura 5

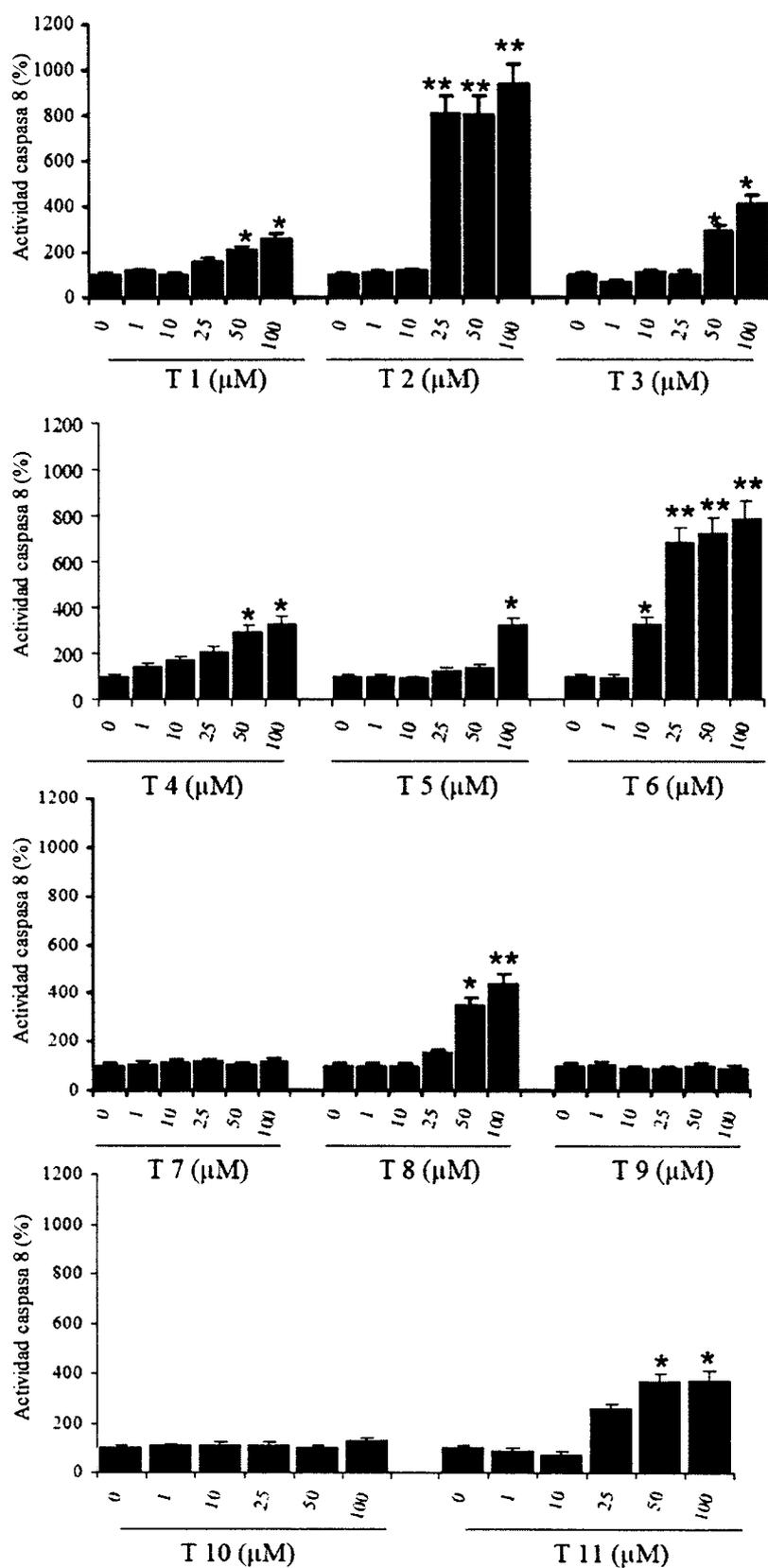


Figura 6

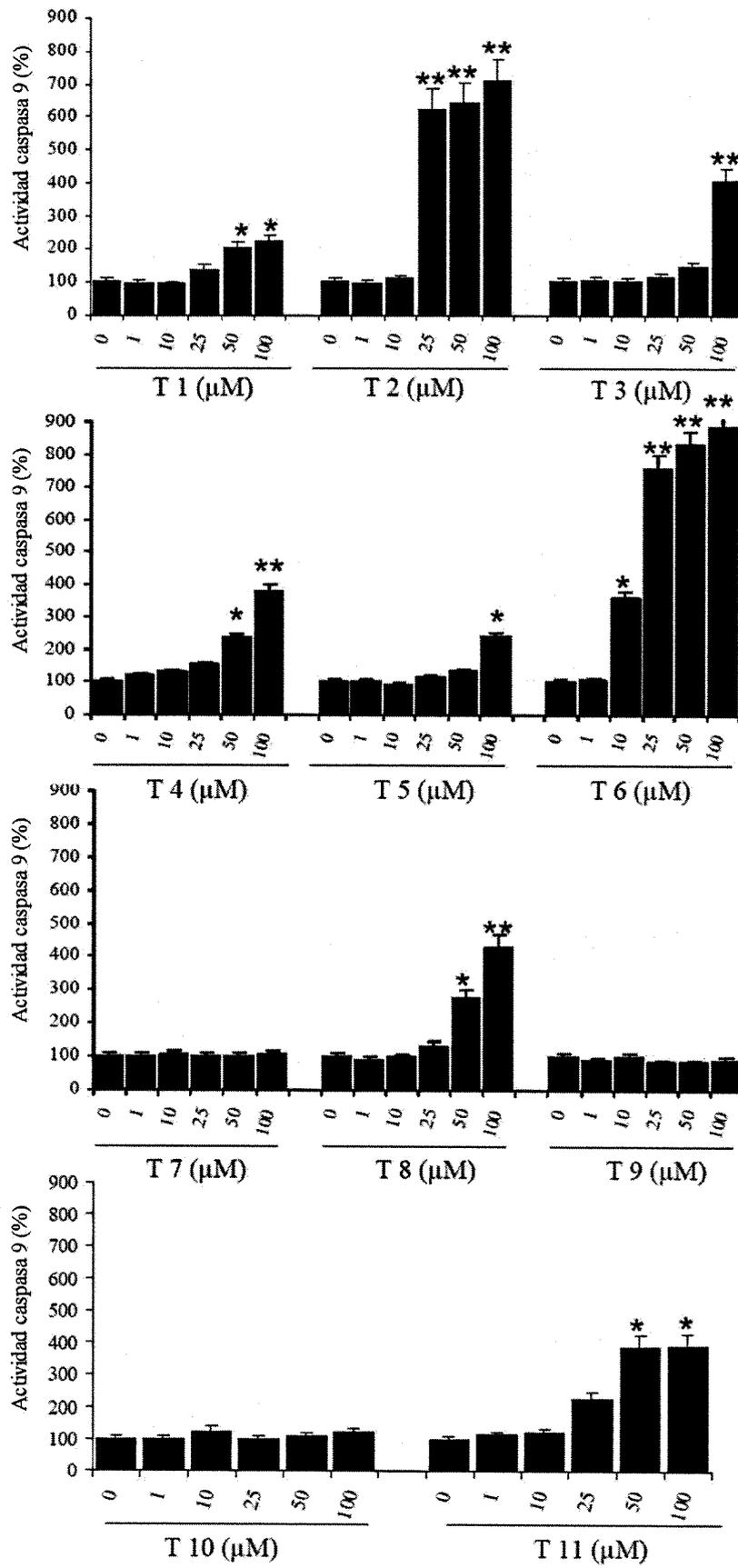


Figura 7

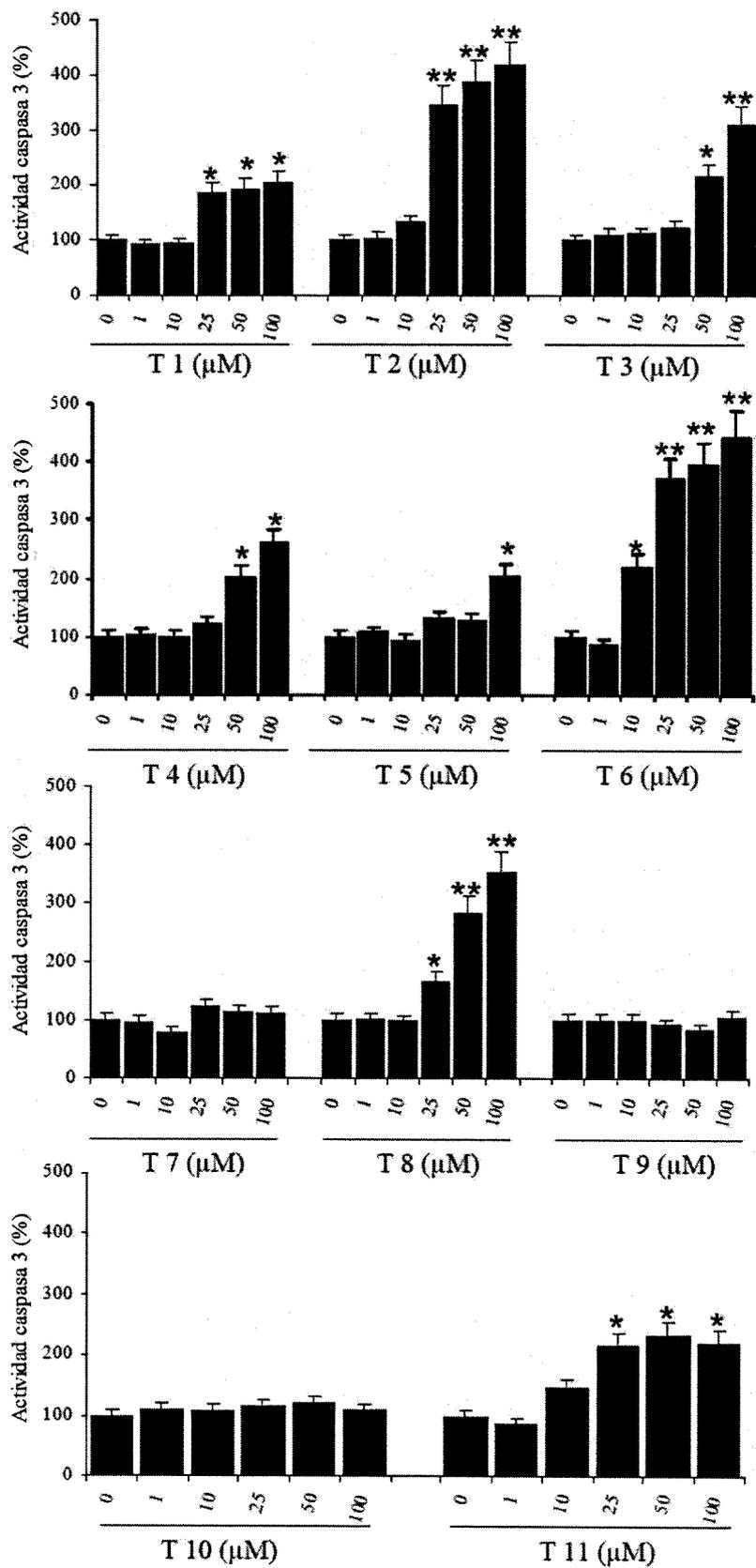


Figura 8

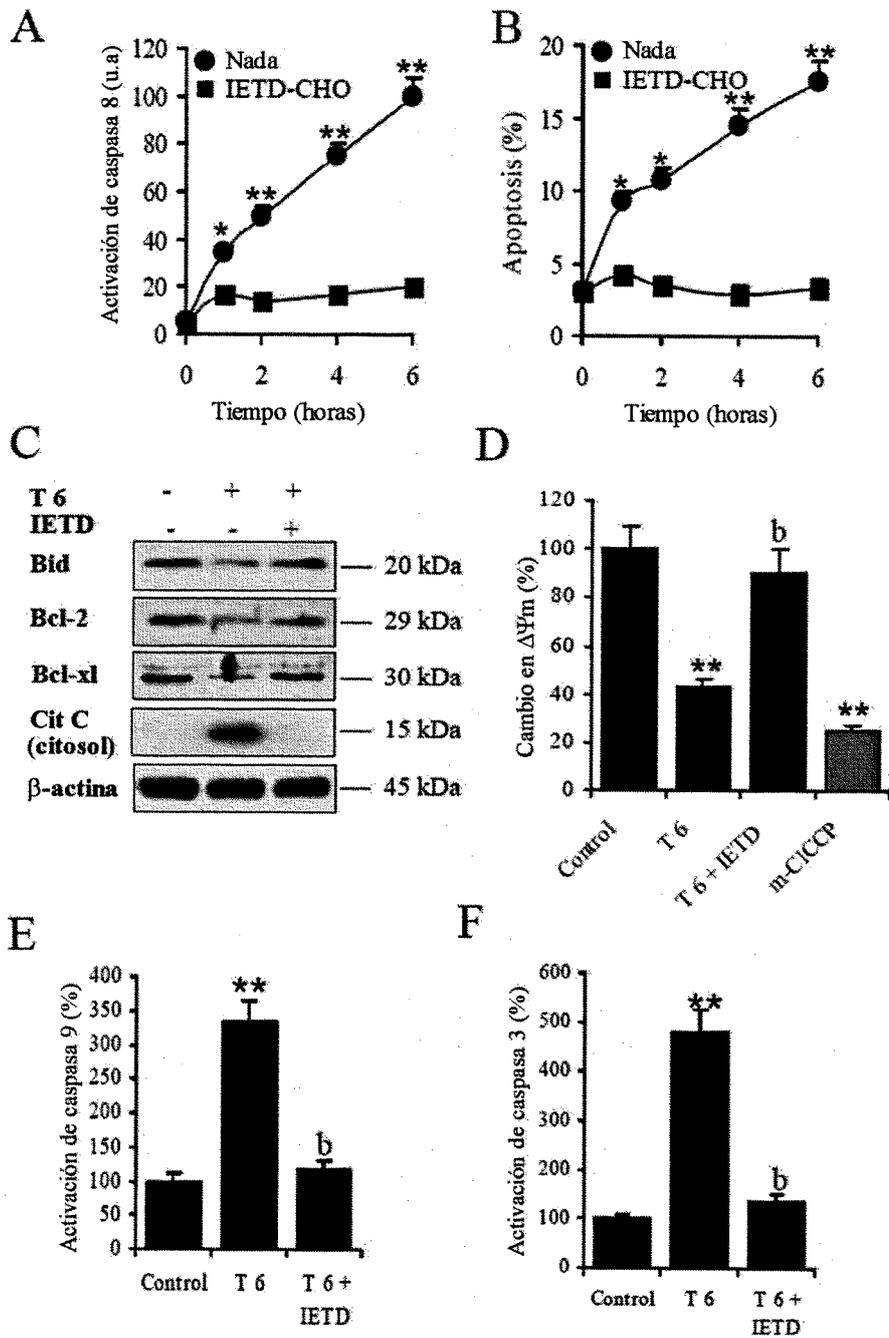


Figura 9

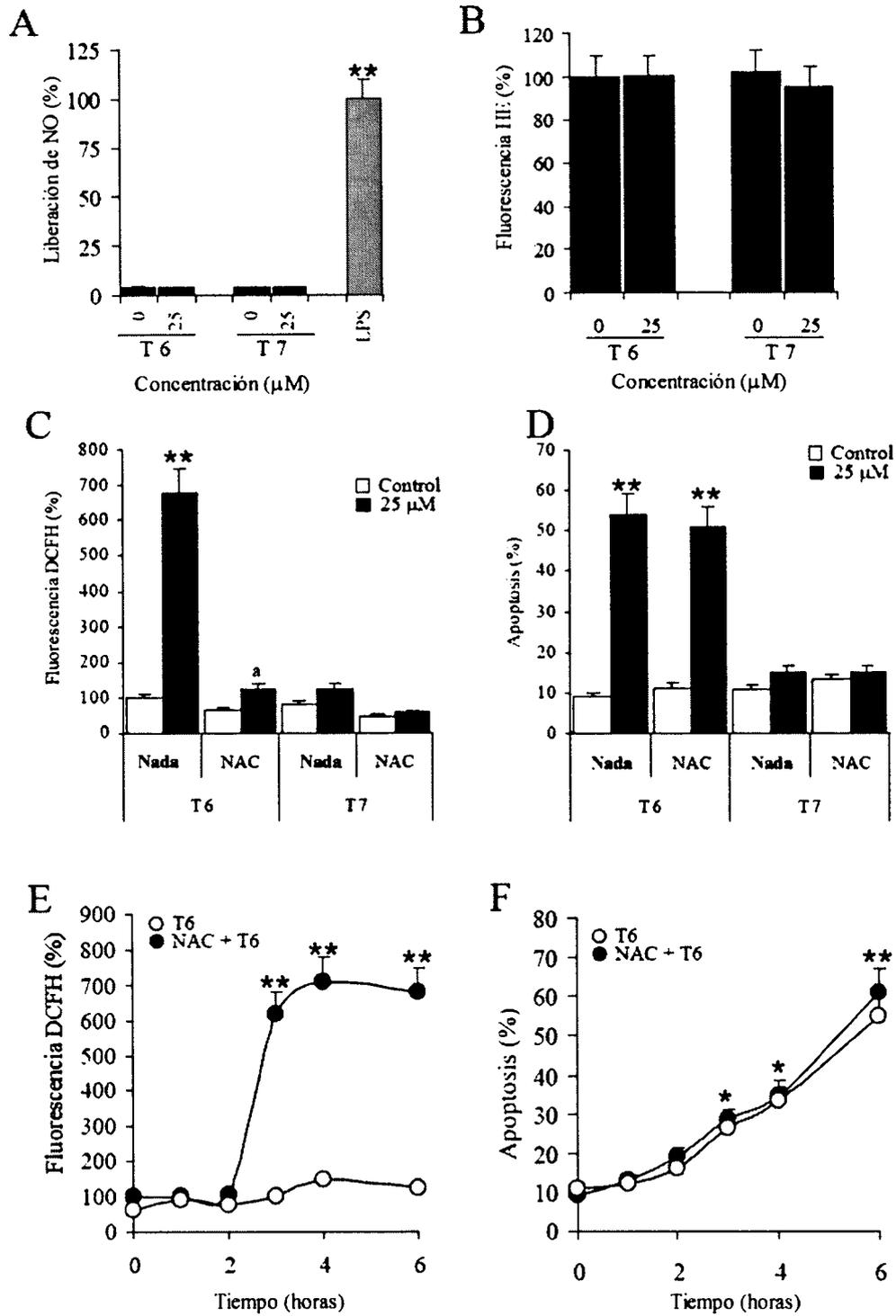


Figura 11

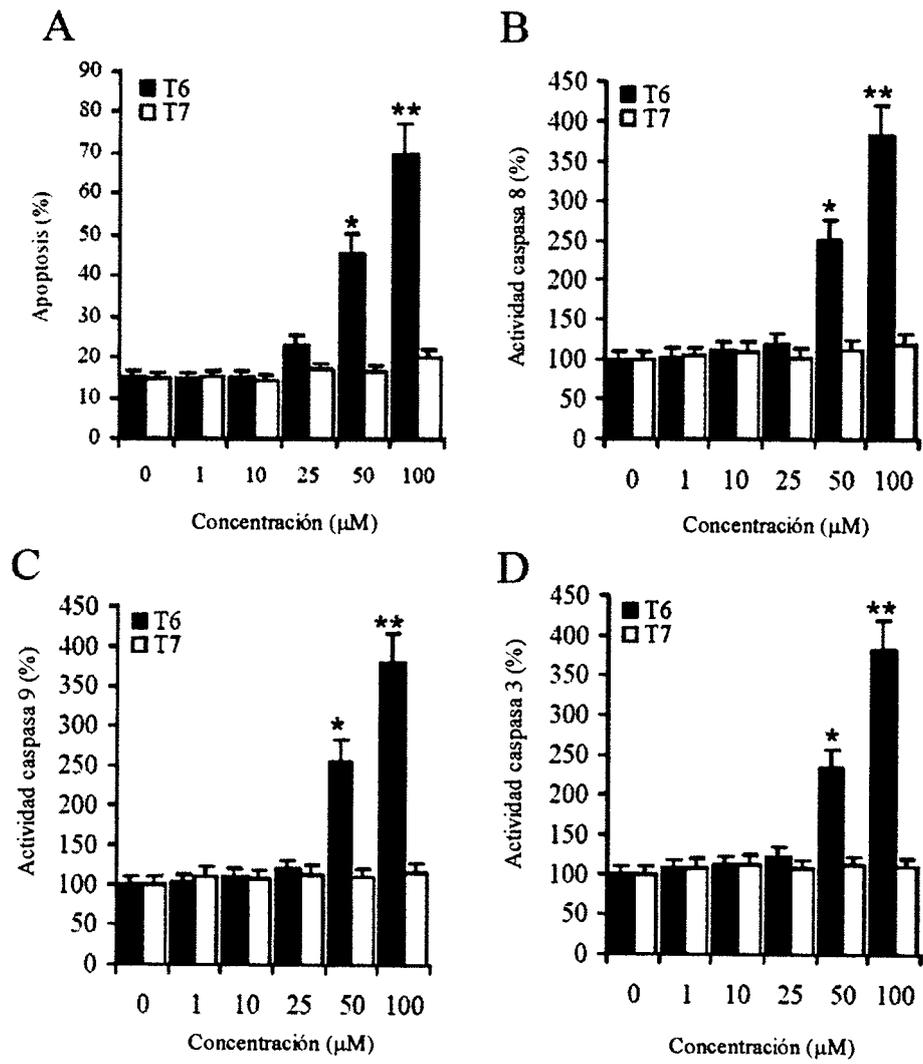


Figura 12



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 333 836

② Nº de solicitud: 200802523

③ Fecha de presentación de la solicitud: 29.08.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 31/341** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | GIRON, N. y col. Suppression of inflammatory responses by labdane-type diterpenoids. Toxicology and Applied Pharmacology. 15 Abril 2008, Vol. 228, Nº 2, páginas 179-189, ISSN 0041-008X. Página 182; página 183, figura 3B. | 1-18 |
| X | NIETO-MENDOZA, E. y col. Electro-oxidation of Hispanolone and anti-inflammatory properties of obtained derivatives. Journal of Organic Chemistry. 2005, Nº 70, Nº 11, páginas 4538-4541. Página 4541. | 1-10 |
| X | CITOGLU, G. S. y col. Antifungal diterpenoids and flavonoids from Ballota inaequidens. Pharmaceutical Biology. 2004, Vol. 42, Nº 8, páginas 659-663, ISSN: 1388-0209. Todo el documento. | 1-10 |
| A | US RE39061 E (MEDEXIS S.A.) 11.04.2006, reivindicaciones 3,31-35; ejemplos 5,6,7. | 1-18 |
| A | ZHOU, JING y col. Critical role of pro-apoptotic Bcl-2 family members in andrographolide-induced apoptosis in human cancer cells. Biochemical Pharmacology. 2006, Nº 72, páginas 132-144. Todo el documento. | 1-18 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

14.12.2009

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, BEILSTEIN, MEDLINE, XPESP, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.12.2009

Declaración

| | | |
|--|------------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 15-18 | SÍ |
| | Reivindicaciones 1-14 | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | SÍ |
| | Reivindicaciones 1-18 | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|-------------------------------------|-------------------|
| D01 | Toxicology and Applied Pharmacology | 15-04-2008 |
| D02 | Journal of Organic Chemistry. | 2005 |
| D03 | Pharmaceutical Biology. | 2004 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a compuestos con estructura diterpenoide furánica tipo labdano de fórmula general I, a las composiciones de estos compuestos junto con un ligando para un receptor de muerte, a un procedimiento in vitro para inducir apoptosis en una célula que utiliza los compuestos de la invención en ausencia del lipopolisacárido LPS, y por último un procedimiento para la identificación de compuestos con actividad anti-apoptótica.

El documento D01 divulga 11 compuestos diterpenoides tipo labdano derivados de Hispanolona, de los cuales 8 son iguales a los reivindicados en la presente solicitud (página 182, figura 1). Los datos presentados en este artículo demuestran que los compuestos nombrados por los autores del artículo como 4 y 11, que coinciden con los compuestos T4 y T11 de la solicitud, tienen una potente actividad antiinflamatoria en macrófagos. La baja toxicidad de estos compuestos en cultivos celulares junto con su efectividad antiinflamatoria en el modelo animal in vivo, indica su uso potencial en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

El documento D02 analiza las propiedades antiinflamatorias del compuesto Hispanolona (compuesto T1 de la solicitud) y derivados. Los autores concluyen diciendo que Hispanolona tiene una buena actividad antiinflamatoria y muy baja toxicidad.

El documento D03 divulga que Hispanolona (compuesto T1 de la presente solicitud) muestra buena actividad como antifúngico frente a *Candida albicans* y *C. krusei*.

Los compuestos recogidos en la presente solicitud son conocidos en el estado de la técnica (documentos D01 a D03), en consecuencia las reivindicaciones 1 a 10 carecen de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

En relación al procedimiento in vitro para inducir apoptosis en una célula, en ausencia del lipopolisacárido LPS, recogido en la reivindicación 11, en el documento D01, en los estudios de inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) y citotoxicidad de los 11 compuestos diterpenoides, realizados en macrófagos RAW, los autores señalan que a concentraciones de 1, 10 y 20 μM , los compuestos 4 y 11 no tienen efecto en la apoptosis inducida por el lipopolisacárido LPS, pero con los compuestos 6, 8 y 9 a concentraciones 50 μM el efecto inhibitorio de la producción de NO es debido a sus efectos citotóxicos, incrementando el nivel de apoptosis inducida por LPS.

Dado que la solicitud no explica la relevancia que supone la ausencia de LPS en los cultivos ensayados, y aunque D01 refuerza el efecto inesperado de los compuestos 4 y 11 (T4 y T11 de la solicitud) como inductores de la apoptosis, la reivindicación de ellos junto con compuestos pro-apoptóticos (divulgado en D01), resulta en una falta de novedad para toda la reivindicación en su conjunto. Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones 11 a 14 de la solicitud carecen de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

Así mismo la utilización de los compuestos reivindicados para la identificación de inhibidores de apoptosis, sería obvio para un experto en la materia. En consecuencia se considera que las reivindicaciones 15 a 18 carecen de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).