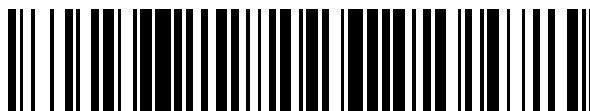


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 455**

51 Int. Cl.:

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2008** **E 16156335 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018** **EP 3050566**

54 Título: **Un grupo novedoso de inhibidores de la ruta STAT3 e inhibidores de la ruta de células madre de cáncer**

30 Prioridad:

10.09.2007 US 971144 P

13.12.2007 US 13372

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

21.05.2019

73 Titular/es:

BOSTON BIOMEDICAL, INC. (100.0%)

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 713 455 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un grupo novedoso de inhibidores de la ruta STAT3 e inhibidores de la ruta de células madre de cáncer.

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere en general al uso de inhibidores de la ruta de Stat3 para tratar afecciones. Más específicamente, la divulgación se refiere al uso de los inhibidores de la ruta STAT3 para atacar a células madre de cáncer y para tratar otros trastornos. Aún más específicamente, la divulgación se relaciona con el uso de nafto[2,3-b]furan-4,9-diona y compuestos relacionados para inhibir Stat3, para atacar a las células madre de cáncer y para tratar enfermedades malignas. La divulgación también se refiere al tratamiento para cánceres refractarios, recurrentes o metastásicos, y a procesos para preparar compuestos relevantes y sus intermedios, y a la composición farmacéutica de compuestos relevantes.

Antecedentes de la invención

Células madre de cáncer (CSC).

15 En los últimos años, un nuevo modelo de tumorigénesis ha ganado una amplia aceptación, donde se supone que solo una pequeña fracción de la masa tumoral total es responsable de las actividades tumorigénicas dentro del tumor, mientras que el modelo genético antiguo o clonal postula que todas las células tumorales mutadas contribuyen igualmente a tales actividades tumorigénicas. Esta pequeña fracción de células tumorigénicas, según el nuevo modelo, son células transformadas con cualidades similares a las de las células madre y se denominan "células madre cancerosas" (CSC). Bonnet and Dick demostraron por primera vez, *in vivo*, la presencia de CSC en la leucemia mieloide aguda (LMA) durante la década de 1990. Sus datos mostraron que solo una pequeña subpoblación de células de AML humanas tenían la capacidad de transferir AML cuando se trasplantaban a ratones inmunodeficientes, mientras que otras células de AML eran incapaces de inducir leucemia. Más tarde, se demostró que estas CSC tienen los mismos marcadores celulares, CD34⁺/CD38⁻, como células madre hematopoyéticas primitivas [1]. Desde entonces, los investigadores han encontrado CSC de manera concluyente en diversos tipos de tumores, incluidos los de cerebro, mamas, piel, próstata, etc.

25 El modelo CSC de tumorigénesis explicaría por qué decenas o cientos de miles de células tumorales necesitan ser inyectadas en un animal experimental para establecer un trasplante de tumor. En la AML humana, la frecuencia de estas células es inferior a 1 en 10.000 [2]. Aunque es raro en una determinada población de células tumorales, existe una creciente evidencia de que tales células existen en casi todos los tipos de tumores. Sin embargo, como las líneas celulares de cáncer se seleccionan de una subpoblación de células cancerosas que están específicamente adaptadas para crecer en cultivos de tejidos, las propiedades biológicas y funcionales de las líneas de células cancerosas pueden sufrir cambios dramáticos. Por lo tanto, no todas las líneas celulares de cáncer contienen CSC.

35 Las células madre de cáncer comparten muchos rasgos similares con las células madre normales. Por ejemplo, las CSC tienen capacidad de autorrenovación, es decir, la capacidad de dar lugar a células madre cancerígenas tumorigénicas adicionales, por lo general a un ritmo más lento que otras células tumorales en división, en oposición a un número limitado de divisiones. Las CSC también tienen la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de células, lo que explicaría la evidencia histológica de que no solo muchos tumores contienen múltiples tipos de células nativas del órgano huésped, sino también que la heterogeneidad se mantiene comúnmente en las metástasis tumorales. Se ha demostrado que las CSC son fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la recurrencia del cáncer. Las CSC también se denominan células iniciadoras de tumores, células similares a células madre cancerosas, células cancerosas similares a células madre, células altamente tumorigénicas, células madre tumorales, células madre tumorales sólidas o células súpermalinas.

45 La existencia de células madre cancerosas tiene implicaciones fundamentales para futuros tratamientos y terapias contra el cáncer. Estas implicaciones se manifiestan en la identificación de la enfermedad, la selección selectiva de fármacos, la prevención de la metástasis y la recurrencia del cáncer y el desarrollo de nuevas estrategias para combatir el cáncer.

50 La eficacia de los tratamientos actuales contra el cáncer se mide, en las etapas iniciales de la prueba, a menudo por el tamaño de la contracción del tumor, es decir, la cantidad de masa tumoral que se elimina. Dado que las CSC formarían una proporción muy pequeña del tumor y tendrían características biológicas marcadamente diferentes de sus progenies más diferenciadas, la medición de la masa tumoral no necesariamente seleccionará los medicamentos que actúan específicamente en las células madre. De hecho, las células madre de cáncer parecen ser resistentes a la radioterapia (XRT) y también son refractarias a los fármacos quimioterapéuticos y dirigidos [3-5]. Las células madre somáticas normales son naturalmente resistentes a los agentes quimioterapéuticos: tienen varias bombas (como la MDR) que bombean los fármacos y las proteínas de reparación del ADN. Además, también tienen una velocidad lenta de recambio celular mientras que los agentes quimioterapéuticos se dirigen a las células que se replican rápidamente.

55 Las células madre de cáncer, que son las contrapartes mutadas de las células madre normales, también pueden tener mecanismos similares que les permitan sobrevivir a las terapias con medicamentos y al tratamiento de radiación. En otras palabras, las quimioterapias y radioterapias convencionales matan las células diferenciadas o diferenciadoras, que forman la mayor parte del tumor que no pueden generar nuevas células madre cancerosas altamente

tumorigénicas. La población de células madre cancerosas que dieron origen a las células diferenciadas y diferenciadoras, por otro lado, podría permanecer intacta y provocar una recaída de la enfermedad. Un peligro adicional para la terapia anticancerígena convencional es la posibilidad de que el tratamiento quimioterapéutico deje solo células madre cancerosas resistentes a la quimioterapia, y el tumor recurrente resultante probablemente también sea resistente a la quimioterapia.

Dado que las células madre cancerosas supervivientes pueden repoblar el tumor y causar una recaída, es imperativo que las terapias contra el cáncer incluyan estrategias contra las CSC (véase la Figura 1). Esto es similar a eliminar las raíces para evitar que vuelvan a crecer los dientes de león, incluso si se ha cortado la masa a nivel del suelo [6]. Al dirigirse selectivamente a las células madre de cáncer, es posible tratar a pacientes con tumores agresivos no resecables y cánceres refractarios o recurrentes, así como prevenir la metástasis y la recurrencia del tumor. El desarrollo de terapias específicas dirigidas a las células madre de cáncer puede mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con cáncer, especialmente para quienes padecen cánceres metastásicos. La clave para desbloquear este potencial sin explotar es la identificación y validación de rutas que son selectivamente importantes para la autorrenovación y supervivencia de las células madre de cáncer. Desafortunadamente, aunque en el pasado se han dilucidado múltiples rutas que subyacen a la tumorigénesis en el cáncer o la autorrenovación en células madre adultas y embrionarias, no se han identificado y validado rutas para la autorrenovación y supervivencia de las células madre de cáncer.

También se ha investigado mucho sobre la identificación y el aislamiento de células madre cancerosas. Los métodos utilizados explotan principalmente la capacidad de las CSC para el eflujo de medicamentos, o se basan en la expresión de marcadores de superficie asociados con las células madre de cáncer.

Por ejemplo, dado que las CSC son resistentes a muchos agentes quimioterapéuticos, no es sorprendente que las CSC sobreexpresen de manera ubicua las bombas de eflujo de medicamentos, como ABCG2 (BCRP-1) [7-11], y otros miembros de la superfamilia de casetes de unión a ATP (ABC) [12, 13]. En consecuencia, la técnica de población lateral (SP), originalmente utilizada para enriquecer células madre hematopoyéticas y leucémicas, también se empleó para identificar y aislar CSC [14]. Esta técnica, descrita por primera vez por Goodell et al., aprovecha el eflujo diferencial dependiente del transportador ABC de los colorantes fluorescentes como Hoechst 33342 para definir y aislar una población celular enriquecida en CSC [10, 15]. Específicamente, el SP se revela mediante el bloqueo del eflujo de fármaco con el verapamilo, momento en el cual los colorantes ya no pueden extraerse del SP.

Los investigadores también se han centrado en encontrar marcadores específicos que distinguen a las células madre de cáncer de la mayor parte del tumor. Los marcadores de superficie más comúnmente expresados por las células madre de cáncer incluyen CD44, CD133 y CD166 [16-22]. La clasificación de las células tumorales basándose principalmente en la expresión diferencial de estos marcadores de superficie ha representado la mayoría de las CSC altamente tumorigénicas descritas hasta la fecha. Por lo tanto, estos marcadores de superficie están bien validados para la identificación y el aislamiento de células madre cancerosas de las líneas celulares de cáncer y de la mayor parte de los tejidos tumorales.

Ruta Stat3

Hay muchos defectos genéticos diferentes en células cancerosas de mamíferos o humanos, y muchos se han estudiado en la búsqueda para curar el cáncer. Por ejemplo, se ha encontrado que el supresor de tumores p53 es defectuoso o está completamente ausente en más de la mitad de los cánceres humanos. La familia de proteínas STAT (transductores de señal y activadores de la transcripción) son factores de transcripción latentes que se activan en respuesta a las citoquinas/factores de crecimiento para promover la proliferación, la supervivencia y otros procesos biológicos. Entre ellos, Stat3 se activa mediante la fosforilación de un residuo crítico de tirosina mediado por la tirosina quinasas receptoras del factor de crecimiento, las quinasas Janus o las quinasas de la familia Src, etc. Estas quinasas incluyen, entre otras, EGFR, JAKs, Abl, KDR, c-Met, Src, y Her2 [23]. Tras la fosforilación de la tirosina, Stat3 forma homo-dímeros, se traslada al núcleo, se une a elementos específicos de respuesta al ADN en las regiones promotoras de los genes diana e induce la expresión génica [24].

En las células normales, la activación de Stat3 es transitoria y está bien regulada, con una duración de 30 minutos a varias horas. Sin embargo, se encuentra que Stat3 es aberrantemente activo en una amplia variedad de cánceres humanos, incluidos todos los carcinomas principales, así como algunos tumores hematológicos. Stat3 desempeña múltiples funciones en la progresión del cáncer. Como potente regulador de la transcripción, se dirige a los genes implicados en muchas funciones celulares importantes, como Bcl-xl, c-Myc, ciclina D1, Vegf, MMP-2 y survivina [25-30]. También es un regulador negativo clave de la vigilancia inmune de tumores y el reclutamiento de células inmunitarias [31-33].

La ablación de la señalización de Stat3 mediante ARNs antisentido, una forma dominante negativa de Stat3 y/o bloqueo de las tirosina quinasas inhibe ciertas líneas celulares de cáncer o tumores *in vitro* y/o *in vivo* [24, 26, 34, 35]. Pero no se ha establecido empíricamente un vínculo claro entre Stat3 y la funcionalidad de las células madre de cáncer. Los investigadores tampoco han encontrado un inhibidor eficaz de la ruta STAT3 para explorar posibles usos terapéuticos con respecto a los cánceres que se ha encontrado que contienen células madre de cáncer. Como se describió anteriormente, se ha demostrado recientemente que las células madre de cáncer (CSC) son

fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis y la recurrencia, y deben tenerse en cuenta al diseñar cualquier terapia curativa que se dirija a un tumor que se sabe que tiene estas células, sin importar cuán pequeña sea la fracción de la masa tumoral que puedan constituir.

5 En enfermedades distintas del cáncer, se ha demostrado una activación excesiva de Stat3 por Interleuquina 6 (IL6) en varias enfermedades autoinmunes e inflamatorias [36]. Recientemente, se ha revelado que la ruta Stat3 también promueve respuestas inmunes patológicas a través de su papel esencial en la generación de respuestas de células T TH17 [37]. Además, se ha encontrado que la inflamación mediada por la vía IL6-Stat3 es el origen causal común de la aterosclerosis, la enfermedad vascular periférica, la enfermedad arterial coronaria, la hipertensión, la osteoporosis, la diabetes tipo 2 y la demencia.

10 Resumen

La presente invención se define en y por las reivindicaciones adjuntas.

15 La presente divulgación se basa, en parte, en la evidencia empírica proporcionada en el presente documento de que Stat3 desempeña un papel clave tanto en la supervivencia como en la capacidad de autorrenovación de las células madre de cáncer (CSC) en un amplio espectro de cánceres. Por consiguiente, un primer aspecto de la divulgación está dirigido a un método para inhibir una célula madre cancerosa en donde el método comprende inhibir al menos algo, la mayoría o sustancialmente todos (por ejemplo, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95%) de la actividad de la ruta Stat3 en las células madre de cáncer a través de un inhibidor de la ruta Stat3. El método inhibe a la CSC de la autorrenovación o mata a la CSC. El método puede llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo* para tratar un cáncer, especialmente los cánceres que tienen CSC y tienen actividades aberrantes, por ejemplo, hiperactivas de la ruta Stat3. 20 Estos dos criterios pueden cumplirse en virtud del conocimiento institucional, es decir, el cáncer del paciente es de un tipo conocido por tener CSC y actividades aberrantes de la ruta STAT3, o puede confirmarse por el paciente individual, por ejemplo, a través de pruebas realizadas en una biopsia. En una realización preferida, se sabe o se confirma de otro modo que las CSC tienen actividades aberrantes de ruta Stat3.

25 Los cánceres que actualmente se sabe tienen tanto CSC como actividades aberrantes de la ruta Stat3 incluyen y no se limitan a: cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, melanoma, sarcoma, cáncer de hígado, tumores cerebrales, mieloma múltiple y leucemia. También se ha encontrado que muchas de las formas metastásicas de estos cánceres tienen tanto CSC como actividades aberrantes de la ruta Stat3, como el cáncer de mama metastásico. En una característica, los métodos de la presente divulgación se pueden practicar para tratar un cáncer seleccionado de este grupo. En una 30 realización, los métodos de la divulgación se pueden practicar para tratar un cáncer seleccionado entre los siguientes: cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, carcinoma colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer gástrico y cáncer de próstata.

35 Además, como se ha demostrado que las CSC son fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la recurrencia del cáncer, los métodos de la divulgación se pueden practicar para tratar el cáncer que es metastásico, refractario a una quimioterapia o radioterapia, inherentemente resistente a la quimioterapia o que haya causado recaída en el sujeto después de un tratamiento inicial. En una realización, el inhibidor de la ruta de Stat3 se aísla, se purifica o se sintetiza, y se puede seleccionar del grupo que consiste en un inhibidor de Stat3 de molécula pequeña, un agente IARN contra Stat3, un agente antisentido contra Stat3, un inhibidor peptidomimético de Stat3 y un cuarteto G de oligodesoxinucleótido inhibidor de stat3. El mecanismo de inhibición se puede seleccionar del grupo 40 que consiste en inhibir sustancialmente la fosforilación de la proteína Stat3, inhibiendo sustancialmente la dimerización de la proteína Stat3, inhibiendo sustancialmente la translocación nuclear de la proteína Stat3, inhibiendo sustancialmente la actividad de unión al ADN de la proteína Stat3, y sustancialmente la inhibición de las actividades de transcripción de la proteína Stat3.

45 En una realización, el inhibidor es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, un enantiómero, diastereómero, tautómero y una sal o solvato de los mismos (en adelante denominado "Compuesto de la divulgación").

50 En un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona un método para inhibir la actividad de la ruta de Stat3 celular en una célula. El método incluye administrar a la célula una cantidad efectiva del Compuesto de la Divulgación de tal manera que al menos la actividad de la ruta Stat3 no deseada en la célula se reduzca, por ejemplo, al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%. En una realización, la célula es una CSC, o de otro modo cancerosa. El método puede inducir la muerte celular o inhibir la autorrenovación en la célula. El método puede llevarse 55 a cabo *in vitro* o *in vivo*.

En un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con la actividad aberrante de la ruta Stat3 en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende el Compuesto de la Divulgación de

manera que al menos la actividad aberrante de la ruta Stat3 se reduce. En una característica, la actividad aberrante de la ruta Stat3 se puede identificar mediante la expresión de Stat3 fosforilada o un regulador sustituto corriente arriba o corriente abajo de la fosforilación de Stat3. El trastorno puede ser un cáncer. En una realización, se sabe que el cáncer tiene actividades aberrantes de la ruta STAT3 e incluye, entre otras, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, melanoma, carcinomas hepatocelulares, cáncer cervical, sarcomas, tumores cerebrales, cánceres gástricos, mieloma múltiple, leucemia y linfomas. El trastorno también puede ser una afección no cancerosa que se sabe que está asociada con una actividad aberrante de la ruta STAT3, y en una realización, se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, enfermedades inflamatorias del intestino, artritis, trastorno de desmielinización autoinmune, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, lesión por isquemia por reperfusión y esclerosis múltiple.

En un cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un paciente e incluye las etapas para identificar a un paciente mediante una actividad de ruta Stat3 aberrante y administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto de la Divulgación. En una realización, la etapa de identificar al paciente mediante una actividad aberrante de la ruta Stat3 comprende probar la expresión de Stat3 fosforilada o de un regulador sustituto corriente arriba o corriente abajo de la fosforilación de Stat3. La etapa de identificar al paciente mediante una actividad aberrante de la ruta Stat3 puede comprender analizar tejido enfermo o fluido extraído del paciente, que puede ser parte de un tumor.

En un quinto aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un paciente e incluye las etapas de identificar a un paciente diagnosticado con un trastorno asociado con una actividad aberrante de la ruta Stat3 y administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto de la Divulgación. En una realización, la etapa de identificar al paciente comprende probar al menos un biomarcador que indica el trastorno en el paciente.

En un sexto aspecto, la presente divulgación proporciona un kit que incluye al menos un agente para diagnosticar un trastorno asociado con la actividad aberrante de la ruta Stat3, que puede estar probando un biomarcador que indica la presencia del trastorno, y una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto de la Divulgación.

En un séptimo aspecto, la presente divulgación proporciona un kit que incluye al menos un agente para diagnosticar la actividad aberrante de la ruta Stat3, y una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto de la Divulgación. En una realización, el agente prueba la expresión de Stat3 fosforilado o de un regulador sustituto corriente arriba o corriente abajo de la fosforilación de Stat3.

En un octavo aspecto, la presente divulgación proporciona un método para inhibir una o más células madre cancerosas. El método incluye administrar a la célula madre de cáncer una cantidad efectiva del Compuesto de la Divulgación. El método puede llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo* para tratar un cáncer en un sujeto. En una realización, se sabe que el cáncer tiene CSC e incluye, entre otros, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, mieloma múltiple, tumores cerebrales, sarcomas, meduloblastoma y leucemia. En una realización, el cáncer es metastásico. En otra realización, el cáncer es refractario a una quimioterapia o radioterapia. Por ejemplo, el cáncer puede ser inherentemente resistente a la quimioterapia. En otra realización más, el cáncer ha causado recaída en el sujeto después de un tratamiento inicial.

En un noveno aspecto, la presente divulgación proporciona un método para cribar un candidato a fármaco capaz de inhibir una célula madre cancerosa, comprendiendo el método cribar un candidato a fármaco que inhiba la actividad de la ruta Stat3. El candidato a fármaco, en una realización, es capaz de inducir la muerte celular en las células madre de cáncer, y en otra realización, inhibir la autorrenovación de la CSC. En diversas realizaciones, el fármaco candidato es un inhibidor de la molécula Stat3 pequeña, un agente de IARN contra Stat3, un agente antisentido contra Stat3, un inhibidor peptidomimético de Stat3 o un inhibidor de oligodesoxinucleótidos Stat3 del cuarteto G. El candidato a fármaco puede tener la capacidad seleccionada de entre las siguientes: inhibir sustancialmente la fosforilación de la proteína Stat3, inhibir sustancialmente la dimerización de la proteína Stat3, inhibir sustancialmente la translocación nuclear de la proteína Stat3, inhibir sustancialmente la actividad de unión al ADN de la proteína Stat3 e inhibir sustancialmente las actividades de transcripción de la proteína Stat3.

En un décimo aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar un sujeto para cáncer resistente a un tratamiento estándar, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende el Compuesto de la Divulgación. El tratamiento estándar puede ser, por ejemplo, una quimioterapia, una radioterapia y/o cirugía. En una realización, el cáncer es inherentemente resistente a la quimioterapia.

En un undécimo aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la recaída del cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende el Compuesto de la Divulgación. En una realización, la composición farmacéutica se administra como una terapia adyuvante después de la cirugía.

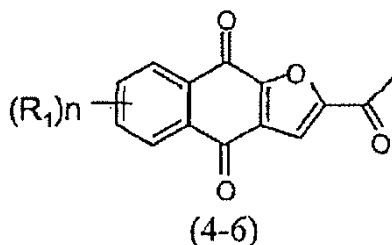
En un duodécimo aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la metástasis del cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende el Compuesto de la Divulgación. En una realización, la composición farmacéutica se administra como una terapia adyuvante después de la cirugía.

- 5 En un decimotercer aspecto, la presente divulgación proporciona un método para dirigirse selectivamente a las células cancerosas en un sujeto, por ejemplo, para tratar una enfermedad maligna, comprendiendo el método administrar a un sujeto una composición farmacéutica que comprende el Compuesto de la Divulgación de tal manera que la concentración de compuestos en el plasma del sujeto no se mantiene por encima de una concentración crítica durante más de 24 horas después de cada dosis, matando así selectivamente las células cancerosas mientras que protege sustancialmente las células normales. Alternativamente, según el método, la concentración plasmática del compuesto no está por encima de la concentración crítica en un cierto punto de tiempo después de cada dosis, por ejemplo, 12, 16, 20 o 24 horas. En una realización, la composición farmacéutica se administra de tal manera que la concentración del compuesto en el plasma del sujeto no se mantiene por encima de una concentración crítica, por ejemplo, continuamente, por más de una duración seleccionada del grupo que consiste en 12, 16 y 20 horas después de cada dosis. En diversas realizaciones, la concentración crítica es de aproximadamente 100 μM , aproximadamente 50 μM , aproximadamente 30 μM o aproximadamente 20 μM . En una realización, las células cancerosas son parte de un cáncer seleccionado del grupo, o cualquiera de sus subgrupos, que consiste en cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer renal, sarcoma, mieloma múltiple, cáncer de mama metastásico, leucemia, linfoma, cáncer de esófago, tumor cerebral, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de vías biliares, cáncer de hueso, cáncer de ojo (retinoblastoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer de pituitaria, cáncer de recto, cáncer de glándula salival, cáncer nasofaríngeo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, neuroblastoma, cáncer de cuello uterino, leucemia, melanoma, epitelioide oral, queratinocitos y cáncer de piel. En otra realización, las células cancerosas forman parte de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama (incluido el tipo metastásico), cáncer cervical, carcinoma colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, y el cáncer de próstata.

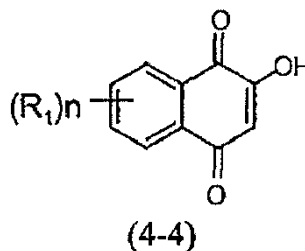
- En un decimocuarto aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la divulgación. Los métodos de acuerdo con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

- En un decimoquinto aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el Compuesto de la Divulgación, es decir, un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una característica, la composición es adecuada para administración oral, nasal, tópica, rectal, vaginal o parenteral, o inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular.

- 40 En un decimosexto aspecto, la presente divulgación también proporciona un proceso de preparación de algunos de los Compuestos de la Divulgación. El método prepara un compuesto de fórmula 4-6,

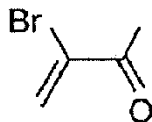


en donde R_1 es H, Cl o F, haciendo reaccionar un compuesto de fórmula 4-4,



5 con una cetona en un solvente en presencia de una base y un agente oxidante. El agente oxidante puede ser, por ejemplo, O₂, Br₂ o CBrCl₃. En una realización, la reacción se lleva a cabo en un contenedor al aire libre. En una característica, todas las etapas del proceso tienen lugar en un recipiente, es decir, en el mismo contenedor. En varias realizaciones de ejemplo, el disolvente puede ser tetrahidrofurano (THF), dioxano o tolueno, y la base puede ser 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), trietilamina o diisopropilamina.

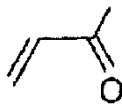
En una realización del proceso anterior, la cetona es un compuesto de fórmula 4-3.



(4-3)

El proceso anterior puede incluir las siguientes etapas:

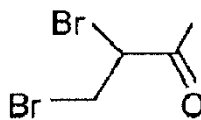
haciendo reaccionar un compuesto de fórmula 4-1,



(4-1)

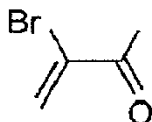
10

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



(4-2)

y posteriormente hacer reaccionar el compuesto de fórmula 4-2 en un disolvente en presencia de una base para producir el compuesto de fórmula 4-3.



(4-3)

15

En un decimoséptimo aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de la fórmula mono-[1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)viniléster] del ácido fosfórico.

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

20 En un decimonoveno aspecto, la presente divulgación proporciona un proceso para preparar el compuesto 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, el proceso comprende hacer reaccionar el compuesto 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona con una solución seleccionada del grupo que consiste en bis(trimetilsilil) amida de litio, bis(trimetilsilil) amida de sodio, y potasio bis(trimetilsilil)amida, seguido de la adición de una solución de clorofosfato de dimetilo. El proceso puede comprender además purificar un producto crudo obtenido a partir de la reacción disolviendo el producto en CH₂Cl₂, lavándolo con NH₄Cl saturado y agua, secándolo sobre MgSO₂, y posteriormente desarrollando el producto a través de cromatografía en columna.

25 En un vigésimo aspecto, la presente divulgación proporciona un proceso para preparar el compuesto mono-[1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furano-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico,

30 comprendiendo el proceso hacer reaccionar el compuesto 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil] éster dimetil éster del ácido fosfórico con bromuro de trimetilsililo. El proceso puede comprender además purificar un producto crudo obtenido a partir de la reacción mediante una HPLC semipreparativa.

Otros aspectos y realizaciones de la presente divulgación se exponen o serán fácilmente evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de las figuras.

- 5 La Figura 1 ilustra las diferencias entre las terapias contra el cáncer específicas para las células madre de cáncer y las convencionales.
- La figura 2 muestra la ruta Stat3 en el cáncer.
- La Figura 3A muestra que Stat3 es constitutivamente activo en las células de Hoechst Side Population.
- La Figura 3B muestra que Stat3 es constitutivamente activo en células CD133⁺.
- Las figuras 4A y 4B muestran que la anulación de Stat3 en las células madre de cáncer induce la apoptosis.
- 10 La Figura 5 muestra que la anulación de Stat3 en las células madre de cáncer inhibe la esferogénesis de las células madre de cáncer.
- La Figura 6 muestra que el compuesto 401 inhibe la actividad de activación de la transcripción de Stat3.
- La Figura 7A muestra que el compuesto 401 inhibe la actividad de unión al ADN de Stat3 en el extracto nuclear.
- La Figura 7B muestra que los compuestos 401, 416 y 418 inhiben la actividad de unión al ADN de Stat3 en el extracto nuclear.
- 15 La Figura 8A muestra que el compuesto 401 inhibe la actividad de unión al ADN de Stat3 en tejidos tumorales de xenoinjerto.
- La Figura 8B muestra que el compuesto 401 inhibe el nivel de expresión de los efectores corriente abajo de Stat3 en tejidos con tumores de xenoinjerto.
- 20 La Figura 9A muestra la clasificación y el análisis de Hoechst Side Population.
- La Figura 9B muestra que Hoechst Side Population es tan sensible como la población no lateral al compuesto 401.
- La Figura 10A muestra que el compuesto 401 es apoptótico a las células de la población lateral Hoechst.
- La Figura 10B muestra que el compuesto 401 es apoptótico a las células CD133⁺.
- La Figura 11 muestra que el compuesto 401 bloquea la formación de la esfera de CD44^{alta}.
- 25 La Figura 12 muestra que el tratamiento del compuesto 401 *in vivo* disminuye la esferogénesis de las células tumorales xenoinjertadas.
- La Figura 13 muestra que el compuesto 401 induce apoptosis en células cancerosas.
- La Figura 14 muestra que el compuesto 401 exhibe actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano y se comporta de manera diferente a la quimioterapia estándar en que elimina el rebote del tumor.
- 30 La Figura 15 muestra que el compuesto 401 exhibe actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de cáncer de cabeza y cuello humano.
- La Figura 16 muestra que el compuesto 401 exhibe actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano.
- La Figura 17 muestra que el compuesto 401 exhibe actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata humano.
- 35 La Figura 18 muestra que el compuesto 401 exhibe actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano.
- La Figura 19 muestra que el compuesto 401 exhibe actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de cáncer de hígado humano.
- 40 La Figura 20 muestra que el compuesto 401 inhibe la metástasis en el modelo ISMS.
- La Figura 21 muestra la farmacocinética del compuesto 401 en ratas.

Descripción detallada

Como se usa en este documento, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células que incluyen mezclas de las mismas.

5 Los términos "aislado" o "purificado", como se usan en este documento, se refieren a un material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente mediante técnicas de química analítica como la electroforesis en gel de poliacrilamida o la cromatografía líquida de alto rendimiento.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "células madre de cáncer" y "CSC" son intercambiables. Las CSC son de mamíferos y, en realizaciones preferidas, estas CSC son de origen humano, pero no pretenden limitarse a ellas. Las células madre de cáncer se definen y se caracterizan funcionalmente como una población de células que se originan a partir de un tumor sólido que: 1) tiene una capacidad proliferativa extensa; 2) son capaces de una división celular asimétrica para generar uno o más tipos de progenie diferenciada con un potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de divisiones celulares simétricas para la autorrenovación o el mantenimiento propio. Otras metodologías comunes para caracterizar las CSC incluyen la morfología y el examen de los marcadores de la superficie celular, el perfil transcripcional y la respuesta farmacológica. Las CSC también se denominan en la literatura de investigación células tumorales/iniciadoras de cáncer, células similares a células madre cancerosas, células cancerosas similares a células madre, células altamente tumorigénicas, células madre tumorales, células madre tumorales sólidas, células con supervivencia a fármacos (DSC), células resistentes a fármacos (DRC) o células supermalignas.

20 Como se usa en el presente documento, el término "autorrenovación" se refiere a la capacidad de las células madre de cáncer para dar lugar a nuevas células madre cancerosas tumorigénicas para reponer o aumentar su número.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en los mamíferos en los que una población de células se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. "Células cancerosas" y "células tumorales", como se usa en el presente documento, se refieren a la población total de células derivadas de un tumor que incluye ambas células no tumorigénicas, que comprenden la mayor parte de la población de células tumorales y las células madre tumorigénicas (células madre cancerosas). Ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón escamoso, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, 25 cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

30 "Tumor" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier masa de tejido que resulta del crecimiento o proliferación celular excesivo, ya sea benigno (no canceroso) o maligno (canceroso) que incluye lesiones precancerosas.

35 "Metástasis" como se usa en este documento se refiere al proceso por el cual un cáncer se disemina o transfiere desde el sitio de origen a otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en la nueva ubicación. Una célula "metastásica" o "que hace metástasis" es aquella que pierde los contactos adhesivos con las células vecinas y migra a través del torrente sanguíneo o la linfa desde el sitio primario de la enfermedad para invadir las estructuras corporales vecinas.

40 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), que incluye, entre otros, humanos, primates no humanos, roedores y similares, que debe ser el receptor de un tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento en referencia a un sujeto humano.

45 Términos tales como "que trata" o "tratamiento" o "tratar" o "que alivia" o "aliviar" como se usa en el presente documento se refieren a 1) medidas terapéuticas que curan, desaceleran, disminuyen los síntomas y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado y 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen o retardan el desarrollo de una afección o trastorno patológico específico. Así, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno; aquellos propensos a tener el trastorno; y aquellos en quienes se debe prevenir el trastorno. Un sujeto se "trata" con éxito de acuerdo con los métodos de la presente divulgación si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en el número o ausencia completa de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición o ausencia de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, incluida la propagación del cáncer en tejidos blandos y huesos; inhibición o ausencia de metástasis tumoral; inhibición o ausencia de crecimiento tumoral; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; reducción de la morbilidad y la mortalidad; y mejora en la calidad de vida.

50 Como se usa en el presente documento, el término "que inhibe", "inhibir" y sus equivalentes gramaticales, cuando se usan en el contexto de una bioactividad, se refieren a una regulación negativa de la bioactividad, que puede reducir o

eliminar la función objetivo, como la producción de una proteína o la fosforilación de una molécula. En realizaciones particulares, la inhibición puede referirse a una reducción de aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de la actividad dirigida. Cuando se utilizan en el contexto de un trastorno o enfermedad, los términos se refieren al éxito en la prevención de la aparición de síntomas, el alivio de los síntomas o la eliminación de la enfermedad, afección o trastorno.

El término "excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un agente de relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulación, involucrado en el transporte o transportar el agente farmacéutico objetivo de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de com y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; Solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones reguladoras de fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. Agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como lauril sulfato de sodio, estearato de magnesio y copolímero de óxido de polietileno-óxido de polipropileno, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes, también pueden estar presentes en las composiciones.

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

Los solvatos de los compuestos de la divulgación también se contemplan en el presente documento. Los solvatos de los compuestos de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, hidratos.

Estudios recientes han descubierto la presencia de células madre cancerosas (CSC) con una capacidad exclusiva para regenerar tumores. Estos CSC existen en casi todos los tipos de tumores y están vinculados funcionalmente con el crecimiento maligno continuo, la metástasis del cáncer, la recurrencia y la resistencia a los medicamentos contra el cáncer. Las CSC y sus progenies más diferenciadas parecen tener características biológicas marcadamente diferentes. Las pruebas de detección de fármacos convencionales contra el cáncer dependen de la medición de la cantidad de masa tumoral, por lo tanto, es posible que no necesariamente seleccionen fármacos que actúen específicamente en las CSC. De hecho, se ha demostrado que las CSC son resistentes a las quimioterapias y radioterapia estándar, y se enriquecen después de los tratamientos anticancerígenos estándar, lo que resulta en cáncer recurrente y recurrencia. Los métodos para aislar estas células incluyen, entre otros, la identificación por su capacidad de eflujo Hoechst 33342, la identificación por los marcadores de superficie que expresan estas células, como CD133, CD44, CD166 y otros, y el enriquecimiento por su propiedad tumorigénica. La creciente evidencia que vincula las células madre de cáncer con la tumorigénesis desentraña la enorme oportunidad terapéutica de atacar a las células madre de cáncer.

La clave para desbloquear este potencial sin explotar es la identificación y validación de rutas que son selectivamente importantes para la autorrenovación y supervivencia de CSC. Aunque en el pasado se han dilucidado múltiples rutas que subyacen a la tumorigénesis en el cáncer y en las células madre embrionarias o en las células madre adultas, no se ha identificado y validado ninguna ruta para la autorrenovación y supervivencia de la CSC.

La presente divulgación proporciona evidencia de que la actividad de la ruta Stat3 es crítica tanto para la supervivencia como para la autorrenovación de las CSC (Ejemplo 1). La presente divulgación proporciona además compuestos que son inhibidores efectivos de las actividades de la ruta Stat3 (Ejemplo 2). La presente divulgación también proporciona datos tanto *in vitro* como *in vivo* de que estos inhibidores de Stat3 inhiben la autorrenovación de las CSC y son apoptóticos a las CSC (Ejemplo 3). La presente divulgación también muestra que estos compuestos pueden destruir selectivamente un amplio espectro de células cancerosas *in vitro* (Ejemplo 4) e inhibir una amplia gama similar de cánceres *in vivo* (Ejemplo 5). Además, la presente divulgación confirma empíricamente la eficacia de los inhibidores

de Stat3 contra el cáncer metastásico (Ejemplo 6). Además, la presente divulgación confirma empíricamente que estos compuestos pueden lograr una exposición a PK deseada para la destrucción selectiva de células cancerosas *in vivo* (Ejemplo 7).

5 Los datos proporcionados en el presente documento, combinados con avances recientes en la investigación de CSC, permiten que la presente divulgación proporcione una serie de métodos dirigidos a inhibir CSC, o tratar cánceres que tienen CSC en cánceres específicos o en general. En el presente documento también se proporcionan métodos dirigidos a inhibir la actividad de la ruta de Stat3 en las células, o tratar trastornos, tanto cancerosos como no cancerosos, que están asociados con actividades aberrantes de la ruta de Stat3. La presente divulgación también proporciona métodos relacionados (por ejemplo, fabricación y criba de candidatos a fármaco), materiales, composiciones y kits.

10 Con el hallazgo de que la regulación negativa o el bloqueo de la ruta de Stat3 inhibe la autorrenovación y la supervivencia de las CSC (Ejemplo 1), la presente descripción proporciona un método para inhibir las células madre de cáncer donde se inhibe al menos cierta actividad de la ruta de Stat3 en las CSC. Un inhibidor de la ruta STAT3. En una realización, la mayoría, es decir, más del 50%, de la actividad de la ruta Stat3 está inhibida. En otra realización, sustancialmente toda la actividad de la ruta Stat3 está inhibida. El método puede evitar que las CSC se renueven automáticamente, de modo que ya no puedan reponer sus números al dividirse en células CSC tumorigénicas. O bien, el método puede inducir la muerte celular en CSC.

15 Este método puede usarse para tratar el cáncer de un sujeto. Los cánceres que se sabe que tienen CSC y actividades aberrantes (por ejemplo, hiperactivas o constitutivamente activas) de la ruta STAT3 son buenos candidatos para dicho tratamiento e incluyen, entre otros: cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, melanoma, carcinomas hepatocelulares, cáncer cervical, sarcomas, tumores cerebrales, cánceres gástricos, mieloma múltiple, leucemia y linfomas. En una realización, el método se usa para tratar cánceres de hígado, cánceres de cabeza y cuello, cánceres pancreáticos y/o cánceres gástricos. En otra realización, el método se usa para tratar el mieloma múltiple, los tumores cerebrales y los sarcomas.

20 Además, como se ha demostrado que las CSC son fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la recurrencia del cáncer, se puede practicar cualquier método de la divulgación dirigido a inhibir las CSC para tratar el cáncer que es metastásico, refractario a una quimioterapia o radioterapia, o ha recaído en el sujeto después de un tratamiento inicial.

25 En una realización, el inhibidor es aislado, purificado o sintético, y puede seleccionarse del grupo que consiste en un inhibidor de la molécula Stat3 pequeña, un agente de ARNi contra Stat3, un agente antisentido contra Stat3, un inhibidor peptidomimético de Stat3 y una Inhibidor de los oligodesoxinucleótidos del cuarteto G Stat3. El inhibidor también puede aislarse o purificarse a partir de un producto natural.

30 El mecanismo de inhibición se puede seleccionar para direccionar a cualquier etapa en la ruta de Stat3. Por ejemplo, el inhibidor puede inhibir sustancialmente la fosforilación de la proteína Stat3, inhibir sustancialmente la dimerización de la proteína Stat3, inhibir sustancialmente la translocación nuclear de la proteína Stat3, inhibir sustancialmente la actividad de unión al ADN de la proteína Stat3 y/o inhibir sustancialmente las actividades de transcripción de la proteína Stat3. Alternativamente, el inhibidor de la ruta Stat3 puede inhibir uno o más componentes en sentido ascendente o descendente en la ruta Stat3.

35 La ruta de Stat3 puede activarse en respuesta a citoquinas, tales como IL-6, o por una serie de tirosina quinasas, tales como EGFR, JAKs, Abl, KDR, c-Met, Src y Her2. Los efectores posteriores de Stat3 incluyen, entre otros, Bcl-xl, c-Myc, cyclinD1, Vegf, MMP-2 y survivina (Figura 2). La ruta Stat3 se encuentra aberrantemente activa en una amplia variedad de enfermedades humanas, como se muestra en la Tabla 1. Las muestras clínicas existentes examinadas mostraron que la ruta Stat3 persistentemente activa ocurre en más de la mitad de los cánceres de mama y pulmón, carcinomas hepatocelulares, mielomas múltiples y más del 95% de los cánceres de cabeza y cuello. La Stat3 activada también se ha demostrado en varias enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Además, puesto que las citoquinas, como la interleucina 6, la inflamación mediada es el origen causal común de aterosclerosis [38], enfermedad vascular periférica [39, 40], enfermedad de la arteria coronaria [39, 40], hipertensión [41], osteoporosis [42], diabetes tipo 2 [39], y demencia [43] y gp130-Jaks-Stats es la principal vía activada por IL-6, la inhibición de la ruta STAT3 también puede prevenir estas enfermedades.

Tabla 1. Activación de la ruta STAT3 en enfermedades humanas.

ENFERMEDADES		REF.
ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS	Tumores sólidos	Cáncer de mama [44]
		Cáncer de cabeza y cuello (SCCHN) [45]

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

ENFERMEDADES			REF.
		Linfoma anaplásico de células grandes	[63]
ENFERMEDADES INMUNES	Enfermedades inflamatorias	Enfermedades inflamatorias del intestino	[64]
		Artritis Inflamatoria	[65-67]
		Enfermedad de Crohn	[68]
		Condiciones inflamatorias crónicas	[69]
	Autoimmune	Artritis reumatoide	[65, 66, 70-72]
		Lupus eritematoso sistémico	[73]
	Asma		[74]
	Alergias		[75]
Infecciones		[76]	
TRASTORNOS PROLIFERATIVOS	Psoriasis		[77]
	Queloides		[78]
	Verrugas		[79]
	Síndrome mielodisplásico		[80]
	Policitemia vera		[81]
ENFERMEDADES DEL SNC	Alzheimer		[36, 82, 83]
	Esclerosis múltiple (MS)		[36, 82, 84]

- 5 En una realización, el inhibidor de Stat3 de acuerdo con la presente divulgación es: 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, un enantiómero, diastereómero, tautómero y una sal o solvato de los mismos (el "Compuesto de la invención") (Ejemplo 2). La presente descripción también proporciona datos tanto *in vitro* como *in vivo* de que el Compuesto de la Divulgación inhibe la autorrenovación de las CSC e induce la apoptosis en las CSC (Ejemplo 3).
- 10 Habiendo proporcionado evidencia de que la regulación por disminución de la ruta de Stat3 inhibe las CSC, la presente divulgación proporciona un método para identificar un fármaco candidato capaz de inhibir una célula madre de cáncer. El método comprende la selección de un fármaco candidato que inhibe la actividad de la ruta Stat3. En diversas realizaciones, el fármaco candidato es un inhibidor de Stat3 de molécula pequeña, un agente de IARN contra Stat3, un agente antisentido contra Stat3, un inhibidor de Stat3 peptidomimético o un inhibidor de oligodesoxinucleótido Stat3 del cuarteto G.
- 15 En una realización, el candidato a fármaco es capaz de inducir la muerte celular en CSC o al menos inhibir su autorrenovación. Pueden seleccionarse diversas fases en la ruta para seleccionar al fármaco candidato. Por ejemplo,

diversas formas de realización del método pueden detectar fármacos candidatos que inhiban sustancialmente la fosforilación de la proteína Stat3, inhiben sustancialmente la dimerización de la proteína Stat3, inhiben sustancialmente la translocación nuclear de la proteína Stat3, inhiben sustancialmente las actividades de unión al ADN de la proteína Stat3, o inhibe sustancialmente las actividades de transcripción de la proteína Stat3.

5 Como muestra el Ejemplo 2 a continuación, el Compuesto de la Divulgación inhibe la actividad de transcripción de Stat3, y la actividad de unión al ADN de Stat3 *in vitro*. El Ejemplo 2 muestra además que el Compuesto de la Divulgación inhibe *in vivo* tanto la expresión de los efectores posteriores de Stat3 (por ejemplo, ciclina D1 y survivina) como la actividad de unión al ADN de Stat3.

10 Por consiguiente, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para inhibir la actividad de la ruta celular Stat3 en donde se administra una cantidad eficaz del Compuesto de la Divulgación. En otro aspecto, el Compuesto de la Divulgación puede usarse para formular una composición farmacéutica para tratar o prevenir trastornos o afecciones asociadas con actividades aberrantes de la ruta Stat3. Un trastorno se considera aquí "asociado con" actividades aberrantes de la ruta Stat3 si un paciente que padece el trastorno, que puede ser un subtipo dentro de un tipo de trastorno, tiene típicamente en al menos algunas de las células del paciente actividad aberrante de la ruta Stat3, que puede, pero no necesariamente, contribuye a la patología del trastorno. Algunos de los trastornos que se sabe se asocian con actividades aberrantes de la ruta STAT3 incluyen, entre otros, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades inflamatorias del intestino, artritis, trastorno de desmielinización autoinmune, enfermedad de Alzheimer, derrame cerebral, lesión por reperusión de isquemia y esclerosis múltiple. Algunos de los trastornos que se sabe se asocian con actividades aberrantes de la ruta STAT3 son los cánceres e incluyen, entre otros, diversos tipos de cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de riñón carcinoma de células, melanoma, carcinomas hepatocelulares, cánceres cervicales, sarcomas, tumores cerebrales, cánceres gástricos, mieloma múltiple, leucemia y linfomas.

25 En relación con este aspecto de la divulgación, se proporciona un kit que incluye uno o más agentes para diagnosticar un trastorno asociado con actividades aberrantes de la ruta Stat3, y una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto de la Divulgación u otro inhibidor eficaz de la ruta Stat3. El agente de diagnóstico puede ser cualquier reactivo adecuado según el trastorno sospechoso y puede incluir agentes necesarios para extraer una muestra de sangre, tomar una biopsia, detectar una biomolécula (por ejemplo, un antígeno o un anticuerpo) o extraer información genética de una muestra. El agente puede incluir un disolvente, un detergente, un anticoagulante, un antígeno, un anticuerpo, una enzima, un cebador de PCR, y así sucesivamente.

35 Si un paciente es diagnosticado o no con un trastorno que se sabe que implica actividad aberrante de Stat3, un médico siempre puede ordenar una prueba para ver si hay actividad aberrante de Stat3 en una muestra de biopsia tomada del paciente. Por lo tanto, se proporciona un kit que incluye: uno o más agentes para diagnosticar actividades aberrantes de la ruta Stat3, y una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto de la Divulgación u otro inhibidor de la ruta Stat3 efectiva. En una característica, la actividad aberrante de la ruta Stat3 se puede identificar a través de cualquier medio analítico adecuado para examinar cualquier indicio de dicha actividad, por ejemplo, la expresión (nivel, duración, etc.) de Stat3 fosforilado o de un regulador sustituto corriente arriba o corriente abajo de la fosforilación de Stat3. Al igual que en el kit descrito anteriormente, el agente de diagnóstico puede ser cualquier reactivo adecuado dependiendo de las indicaciones de actividad aberrante de la ruta Stat3 que analiza la prueba.

40 Como muestra el Ejemplo 3 más adelante, el Compuesto de la Divulgación, que es al menos un inhibidor de la ruta Stat3, destruye las células madre de cáncer. El ejemplo 3 también demuestra que el compuesto de la divulgación también inhibe la esferogénesis de CSC, una indicación de la inhibición exitosa de la autorrenovación de CSC, tanto *in vitro* como *in vivo*.

45 Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para inhibir células madre cancerosas en las que se administra una cantidad eficaz del Compuesto de la Divulgación a las células. Los cánceres que se sabe que tienen CSC son buenos candidatos para tales tratamientos e incluyen, entre otros, diversos tipos de cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, mieloma múltiple, tumores cerebrales, sarcomas, meduloblastoma y leucemia.

50 Además, como se ha demostrado que las CSC son fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la recurrencia del cáncer, cualquier método de la divulgación dirigida a la inhibición de las CSC se puede practicar para tratar el cáncer que es metastásico, refractario a una quimioterapia o radioterapia, o que haya causado recaída en el sujeto después de un tratamiento inicial. El Ejemplo 6 a continuación prueba específicamente *in vivo* la eficacia antimetastásica del Compuesto de la Divulgación, y los datos muestran una reducción significativa en el número de focos de tumores primarios y la metástasis hepática espontánea.

55 En el Ejemplo 4 a continuación, se muestra que el Compuesto de la Divulgación no solo causa apoptosis en un amplio espectro de células cancerosas, sino que también muestra selectividad en su citotoxicidad que es crítica para el desarrollo de agentes terapéuticos de baja toxicidad. La citotoxicidad selectiva, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un compuesto para matar células cancerosas y al mismo tiempo preservar

sustancialmente las células normales, a veces bajo ciertas condiciones. Las células normales generalmente se refieren a células sanas no tumorigénicas. Las condiciones que resultan en una citotoxicidad selectiva para un fármaco candidato son difíciles de predecir porque requieren un conocimiento del mecanismo subyacente de la citotoxicidad. Por ejemplo, para reducir la toxicidad de un fármaco anticanceroso que ataca la formación de microtúbulos durante la mitosis, existen factores muy diferentes para trabajar que un fármaco que bloquee los procesos metabólicos celulares. Una condición adecuada para generar una citotoxicidad selectiva debe equilibrar la necesidad de que el medicamento sea lo suficientemente tóxico para matar efectivamente las células cancerosas mientras que sea lo suficientemente tolerable para las células normales. Por ejemplo, si se usa una concentración más baja, a menudo significa que se necesita una infusión prolongada para matar las células cancerosas.

A partir de los datos generados en los ejemplos de esta divulgación, incluidos los que se muestran en el Ejemplo 4, parece que se puede lograr una citotoxicidad selectiva para el Compuesto de la Divulgación si las células afectadas no están expuestas a una concentración crítica del compuesto de manera continua más allá de cierta duración. En un método destinado a destruir selectivamente las células cancerosas en un sujeto, se administra al sujeto una composición farmacéutica que tiene el Compuesto de la Divulgación, de manera que la concentración del compuesto en el plasma del sujeto no se mantiene por encima de una concentración crítica durante más de 24 horas después de cada dosis. Este método se puede usar para tratar todos los cánceres, incluido cualquiera de los grupos de cánceres descritos aquí, y para tratar el trastorno asociado a Stat3, una lista de ejemplo de los cuales ya se proporcionó anteriormente y no se repite aquí. Alternativamente, la duración puede restringirse aún más a 12, 16 y 20 horas después de cada dosis. La concentración crítica para cada compuesto puede variar. En diversas realizaciones de la presente divulgación, la concentración crítica es aproximadamente 100 μM , aproximadamente 50 μM , aproximadamente 30 μM o aproximadamente 20 μM .

En una realización del método, el cáncer que se está tratando se selecciona del siguiente grupo: cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer renal, sarcoma, mieloma múltiple, cáncer de mama metastásico, cáncer de próstata metastásico, leucemia, linfoma, cáncer de esófago, tumor cerebral, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de vías biliares, cáncer de hueso, cáncer de ojo (retinoblastoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer de pituitaria, cáncer de recto, cáncer de glándula salival y cáncer nasofaríngeo.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto, en donde se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende el Compuesto de la Divulgación. El cáncer puede ser metastásico. El sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

Para cualquiera de los métodos de tratamiento de un sujeto descrito en el presente documento, la presente divulgación proporciona intervalos de dosificación efectivos, frecuencias de dosificación y concentraciones en plasma de los compuestos. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una dosis: (a) de aproximadamente 1 mg/m^2 a aproximadamente 5000 mg/m^2 (I.V.) o de aproximadamente 1 mg/m^2 a aproximadamente 50000 mg/m^2 (PO); (b) de aproximadamente 2 mg/m^2 a aproximadamente 3.000 mg/m^2 (I.V.) o de aproximadamente 10 mg/m^2 a aproximadamente 50000 mg/m^2 (PO). En diversas realizaciones, el compuesto de la presente divulgación se puede administrar cada dos días (Q2D), diario (QD), o dos veces al día (BID). En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía oral y no más de cuatro veces al día (QID).

En una característica, la composición farmacéutica se administra al sujeto de tal manera que la concentración del compuesto en el plasma del sujeto no se mantiene por encima de una concentración crítica durante más de 24 horas (o 12, 16 y 20 horas) después de cada dosis. De acuerdo con realizaciones alternativas de la divulgación, la concentración plasmática del compuesto no excede la concentración crítica en un cierto punto de tiempo después de que cada uno lo hace, por ejemplo, 12, 16, 20 o 24 horas, como un régimen que evita la toxicidad no selectiva. En diversas realizaciones de la presente divulgación, la concentración crítica es aproximadamente 100 μM , aproximadamente 50 μM , aproximadamente 30 μM o aproximadamente 20 μM . Las composiciones, en ciertos casos, son aisladas, purificadas o sintetizadas.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el Compuesto de la Divulgación, y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una característica, la composición es adecuada para administración oral, nasal, tópica, rectal, vaginal o parenteral, o inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular.

Las formulaciones de la presente divulgación incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del mamífero que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo, que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única, será generalmente esa cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del 100%, esta cantidad variará, por ejemplo, de aproximadamente el 1% a

aproximadamente el 99% del ingrediente activo, de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 70%, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30%.

5 Las composiciones terapéuticas o formulaciones de la divulgación adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas (usando una base aromatizada, usualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos o solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como enjuagues bucales y similares, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada del Compuesto de la Divulgación como ingrediente activo. El Compuesto de la Divulgación también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

10 En las formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el Compuesto de la Divulgación se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, como el citrato de sodio o el fosfato dicálcico. y/o cualquiera de los siguientes: rellenos o diluyentes, como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, carbonato de sodio y glicolato de almidón de sodio; agentes retardantes de la solución, tales como parafina; aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol y copolímero de óxido de polietileno-óxido de polipropileno; absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y de relleno duro usando excipientes como lactosa o azúcares lácteos, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

25 Las formas de dosificación líquidas para la administración oral del Compuesto de la Divulgación incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, semillas de algodón, maní, maíz, germen, aceite de oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Adicionalmente, se pueden usar ciclodextrinas, por ejemplo, hidroxipropil- β -ciclodextrina, para solubilizar compuestos.

30 Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes. Las suspensiones, además de uno o más Compuestos de la Divulgación, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

40 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la divulgación para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que puede prepararse mezclando uno o más compuestos de la divulgación, con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorio o un salicilato, que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirá en el recto o cavidad vaginal y liberará los agentes farmacéuticos activos de la invención. Las formulaciones de la presente divulgación que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol que contienen los vehículos que se conocen en la técnica como apropiados.

45 Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de una composición de acuerdo con la divulgación incluyen polvos, aspersores, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, regulador o propelente que pueda ser necesario.

50 Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además del Compuesto de la Divulgación, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

55 Los polvos y aerosoles pueden contener, además de un compuesto de esta Divulgación, excipientes como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Además, los aerosoles pueden contener propelentes habituales, como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, como el butano y el propano.

Las formulaciones oftálmicas, pomadas oculares, polvos, soluciones y similares, también se contemplan dentro del alcance de esta descripción.

Las composiciones farmacéuticas de esta divulgación adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más compuestos de acuerdo con la divulgación en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes.

En algunos casos, para prolongar el efecto de la composición de acuerdo con la descripción, es deseable disminuir su absorción por parte del cuerpo de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución, que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una composición administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el compuesto en un vehículo oleoso. Una estrategia para las inyecciones de depósito incluye el uso de copolímeros de óxido de polietileno-óxido de polipropileno en los que el vehículo es fluido a temperatura ambiente y se solidifica a temperatura corporal.

Los compuestos farmacéuticos de esta divulgación pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes farmacéuticos, o con otras terapias anticancerosas como se describe en el presente documento, así como en combinación con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable comprende un lípido para administración intravenosa. Los lípidos pueden ser: fosfolípidos, fosfatidilcolinas sintéticas, fosfatidilcolinas naturales, esfingomielinas, ceramidas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilgliceroles, ácidos fosfatídicos, colesterol, sulfato de colesterol y hapteno y lípidos conjugados con PEG. El lípido puede estar en forma de nanoemulsión, micelas, emulsiones, suspensión, nanosuspensión, niosomas o liposomas. En una realización, el excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable está en forma de emulsión micelar, suspensión o suspensión de nanopartículas, y además comprende una proteína aceptable por vía intravenosa, por ejemplo, albúmina humana o un derivado de la misma, para administración intravenosa.

En una realización, el excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable comprende un material ceroso para administración oral. El material ceroso puede ser mono-, di- o triglicéridos, ésteres de mono-, di-ácidos grasos de PEG, vitamina E conjugada con PEG (vitamina E TPG) y/o Gelucire. El Gelucire puede seleccionarse entre Gelucire 44/14, Gelucire 43/01, Gelucire 50/02, Gelucire 50/13, Gelucire 37/02, Gelucire 33/01, Gelucire 46/07 y Gelucire 35/10.

En una realización, el excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable se selecciona de capriol, transcutoil hp, labrafil M, labrasol, triacetina, pharماسoil, etanol, polivinilpirrolidina, carboximetil celulosa, Tween 20 y Tween 80. En una realización, el excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, Gelucire 44/14, se mezcla con un tensioactivo, que puede ser Tween 80 o Tween 20. Estas realizaciones de composiciones farmacéuticas pueden formularse adicionalmente para la administración oral.

El Compuesto de la Divulgación se puede sintetizar usando materiales de partida disponibles comercialmente y procesos bien conocidos por los expertos en la técnica de la química orgánica. En los Ejemplos 8-10, la presente divulgación proporciona un proceso de fabricación para algunos de los compuestos reivindicados.

De acuerdo con una o más realizaciones de la presente divulgación, un inhibidor de Stat3 de molécula pequeña se refiere a cualquier fármaco de bajo peso molecular que muestra actividad inhibidora contra Stat3. En comparación con los productos farmacéuticos de mayor peso molecular, como las proteínas, los péptidos y los carbohidratos, las moléculas pequeñas pueden penetrar más fácilmente en las membranas celulares y en la barrera hematoencefálica. Estas moléculas tienden a incurrir en menores costes de desarrollo y fabricación.

De acuerdo con una o más realizaciones de la presente divulgación, una terapia de IARN es el uso directo de la interferencia de ARN (ARNi) en el tratamiento de enfermedades mediante el silenciamiento de genes que dan lugar a proteínas malas y, por lo tanto, a enfermedades. El IARN es un proceso natural que suprime cierta actividad génica en las células vivas. Es una función eucariótica ampliamente conservada que el ARN de doble cadena se desencadena en las células a través de intermedios de dúplex cortos de ARN, como pequeños ARN interferentes (ARNsi). A través de una serie de etapas de procesamiento, una de las dos hebras de los complejos ARNsi con proteínas para formar RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). El RISC reconoce la secuencia de ARN complementaria mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick y luego la escinde. Los IARN también incluyen ARNsh, ARNm_i y otros.

Según una o más realizaciones de la presente divulgación, una terapia antisentido es una forma de tratamiento para trastornos genéticos o infecciones. Cuando se sabe que la secuencia genética de un gen en particular es causante de una enfermedad en particular, es posible sintetizar una cadena de ácido nucleico (ADN, ARN o un análogo químico) que se unirá al ARN mensajero (ARNm) producido por ese gen e inactivarlo, efectivamente desactivando ese gen. Esto se debe a que el ARNm tiene que ser de cadena sencilla para que se traduzca. Este ácido nucleico sintetizado se denomina oligonucleótido "anti-sentido" porque su secuencia de bases es complementaria al ARN mensajero (ARNm) del gen, que se denomina secuencia "en sentido" (de modo que un segmento en sentido del ARNm "3'-AAGGUC-3'" sería bloqueado por el segmento de ARNm antisentido "3'-UUCCAG-5'").

Según una o más realizaciones de la presente divulgación, un peptidomimético es una pequeña cadena similar a una proteína diseñada para imitar un péptido. Típicamente surgen de la modificación de un péptido existente para alterar las propiedades de la molécula. Por ejemplo, pueden surgir de modificaciones para cambiar la estabilidad o la actividad biológica de la molécula. Esto puede tener un papel en el desarrollo de compuestos similares a fármacos a partir de péptidos existentes. Estas modificaciones implican cambios en el péptido que no se producirán de forma natural (como las cadenas principales alteradas y la incorporación de aminoácidos no naturales).

De acuerdo con una o más realizaciones de la presente divulgación, los inhibidores de oligodesoxinucleótidos del cuarteto G son moléculas de ADN catalíticas (ADNzimas) diseñadas para inhibir proteínas independientemente de su actividad de escisión de ARN en las células.

10 Materiales y métodos

Ensayos biológicos

Los compuestos de la presente divulgación se pueden probar de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. La Tabla 2 muestra la lista de compuestos descritos en el protocolo.

Tabla 2

Nombre del Compuesto	Código del Compuesto
2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona	301
2-Acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona	416
2-Acetil-7-Fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona	418
2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona	401
2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona	101
mono-[1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil] éster del ácido fosfórico	4011
1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico	4012

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

20 Población Hoechst Side: Para identificar y aislar la población lateral (SP) y las fracciones no SP, las células SW480 se retiraron de la placa de cultivo con tripsina y EDTA, se sedimentaron por centrifugación, se lavaron con solución salina regulada con fosfato (PBS) y se resuspendió a 37°C en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene 2% de FBS y HEPES 1 mM. Las células se marcaron con Hoechst 33342 (Invitrogen) a una concentración de 5 µg/mL. Las células marcadas se incubaron durante 120 minutos a 37°C, solas o con verapamilo 50 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis). Después de la tinción, las células se suspendieron en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS; 25 invitrogen) que contenía FBS al 2% y HEPES 1 mM, pasaron a través de un filtro de malla de 40 µm y se mantuvieron a 4°C hasta el análisis de citometría de flujo. El colorante Hoechst se excitó a 350 nm, y su fluorescencia se midió a dos longitudes de onda utilizando un filtro de paso de banda de 450 DF10 (filtro de paso de banda de 450/20 nm) y un filtro óptico de 675LP (filtro de borde de paso largo de 675 nm). El control de la dispersión hacia adelante y lateral no fue estricta, y solo se excluyeron los residuos [15].

30 Aislamiento de CSC con marcadores de superficie: La clasificación de células tumorales basada principalmente en la expresión diferencial del (de los) marcador(s) de superficie, como CD44 o CD133, ha tenido en cuenta la mayoría de las CSC altamente tumorigénicas descritas hasta la fecha. El aislamiento de CD133 se basa en el método de Ricci-Vitiani et al. [20], con ligera modificación. Las células CD133⁺ se aislaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o separación magnética basada en nanopartículas. En resumen, se marcaron 10⁷ células/mL con CD133/1 (AC133)-PE para la clasificación de células basada en FACS; o con CD133/1 (AC133)-biotina (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) para la separación basada en campo magnético utilizando el kit de selección de biotina EasySep® (Miltenyi Biotec) según las recomendaciones del fabricante. La marcación no específica se bloqueó con el reactivo de

bloqueo FcR suministrado y las incubaciones de anticuerpos (1:11) se llevaron a cabo en hielo durante 15 minutos en PBS con FBS al 2% y EDTA 1 mM. Se realizaron cinco lavados para el aislamiento de EasySep®, mientras que las células se sedimentaron a 400 x g durante 5 minutos y se resuspendieron a 2×10^7 /mL, antes de la clasificación por FACS.

- 5 Las células CD44^{alta} se aislaron mediante FACS de acuerdo con los métodos descritos en Ponti et al, con una ligera modificación [85]. En resumen, después de la tripsinización y recuperación de las células durante 30 minutos a 37°C en medios de crecimiento, las células se sedimentaron a 400 x g y se resuspendieron en PBS con FBS al 2% y EDTA 1 mM a 1×10^6 células/mL. Las células se incubaron luego en hielo con una dilución 1:100 de CD44-FITC (BD Biosciences, San Diego, CA) durante 15 minutos. Alternativamente, se utilizó CD24-PE (BD Biosciences, San Diego, CA) (1:100) para la selección negativa. Después de lavar tres veces, las células se resuspendieron a 2×10^6 /mL y se pasaron a través de una malla de 40 µM antes de la clasificación.

- 10 Ensayo de esfera: Un método confiable para medir la capacidad de autorrenovación de la población celular es la capacidad de cultivarlas como esferas en ausencia de suero o unión. Las células madre cancerosas CD44^{alta} FaDu o Hoechst de la población lateral fueron cultivadas en placas de fijación ultrabajas en medio de células madre cancerosas (DMEM/F12, suplemento de Neurobasal B27, 20 ng/mL de EGF, 10 ng/mL de FGF, 4 µg/mL de insulina y 0.4% BSA) para permitir la formación de esferas. Típicamente, la formación de esferas se evaluó mediante microscopía después de 10-14 días en cultivo y se puntuaron esferas con >50 células.

- 15 Ensayo de indicador de luciferasa: Las células HeLa se cotransfectaron con el vector indicador Stat3-luciferasa (Stat3-Luc) (Panomics, Fremont, CA) y luciferasa de Renilla (Promega, Madison, WI) utilizando Lipofectamine 2000 como lo describe el fabricante (Invitrogen). Después de la transfección, las células se mantuvieron en medio que contenía FBS al 0.5% durante 24 horas. Las células se trataron con el compuesto indicado durante 30 minutos antes de la adición de 25 ng/mL de oncostatina M (OSM) (R&D Systems, Minneapolis, MN) al medio. A 6 horas después de la adición de OSM, las células se recolectaron y los niveles de luciferasa de luciérnaga y renilla se midieron utilizando el Sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo según lo descrito por el fabricante (Promega).

- 20 Análisis de apoptosis: Las células tratadas con o sin compuesto se recogieron 5 horas después del tratamiento para la tinción con anexina-V. Las células recolectadas se lavaron con PBS y se resuspendieron en regulador que contenía Anexina-V-FITC y se tiñeron según las instrucciones del fabricante (Roche). Las células positivas para anexina-V se determinaron por citometría de flujo.

- 25 Ensayo de unión al ADN de STAT3: El ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) se realizó según lo descrito por el fabricante (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE). En resumen, los extractos nucleares se hicieron a partir de células HeLa utilizando el kit de extracción de proteínas NucBuster tal como lo describe el fabricante (EMD Biosciences, San Diego, CA). Se preincubaron 5 µg de extracto nuclear con la dosis indicada del compuesto indicado durante 30 minutos antes de una incubación de 15 minutos con el oligonucleótido Stat3 consenso marcado con IR700. Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida y se escanearon directamente utilizando el sistema de generación de imágenes infrarrojas Odyssey (Li-Cor Biosciences). Para el ensayo inmunoenzimático (ELISA), se preincubaron 5 µg de extracto nuclear con la concentración indicada del compuesto indicado durante 30 minutos antes de la adición de oligo biotinilado (5'-Biotina-GATCCTTCTGGGAATTCCTAGATC-3', SEQ ID NO. 1). Los complejos de Stat3-DNA se capturaron luego en placas de 96 pozos recubiertas con estreptavidina (Pierce, Rockford, IL). Los complejos unidos se incubaron luego con el anticuerpo policlonal Stat3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) seguido por un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-conejo (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). El anticuerpo unido se visualizó luego mediante la adición de sustrato TMB (Pierce) y se midió la absorbancia a 450 nm.

- 30 Determinación de la viabilidad celular: Para el análisis de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), las células se colocaron en placas de 96 pozos en 10000 células por pozo. A 24 horas después de la siembra, el compuesto se añadió a las células en las dosis indicadas. A 22 horas después de la adición del compuesto, se añadió MTT a cada pozo (0.5 mg/ml, concentración final) y las placas se incubaron durante 2 horas adicionales a 37°C. Luego se aspiró el medio y el producto de formazán se solubilizó en 100 µl de alcohol isopropílico. La absorbancia de cada pozo se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas.

- 35 Inmunofluorescencia: Las células tratadas con el compuesto indicado durante un tiempo indicado se fijaron en formaldehído al 4% o metanol frío para la detección de anexina V, caspasa 3 escindida o stat3, respectivamente. Los cubreobjetos se secaron al aire y se rehidrataron en PBS a temperatura ambiente durante 10 min. Las muestras se incubaron luego en regulador de bloqueo (PBS, 5% FBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Las células se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios. Después del lavado, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:500 de anticuerpo anti-conejo conjugado con FITC. Las imágenes se capturaron con un microscopio Nikon TE200 equipado con epifluorescencia y se obtuvo un anticuerpo anti-caspasa 3 escindidapoliclonal en mosaico SPOT cámara CCD (1:100) de Cell Signaling Technology, Danvers, MA. La anexina-V-FITC se obtuvo de Roche, Penzberg, Alemania. El anticuerpo policlonal anti-Stat3 se obtuvo de Santa Cruz.

- 40 Eliminación de genes mediante tecnología TPIV®: La tecnología TPIV® (identificación y validación de vías terapéuticas) (Boston Biomedical Inc., Norwood, MA, Estados Unidos) proporciona plásmidos que se pueden usar

para transfectar primero las bacterias que, a su vez, son captadas por un sujeto mamífero. Después de la lisis bacteriana, el ARNds codificado por los plásmidos TPIV® y procesado por las bacterias se libera en el citoplasma de las células de los mamíferos y efectúa la eliminación selectiva de genes. La tecnología TPIV® se describe en la Solicitud de Patente PCT No. PCT/US08/68866 presentado el 30 de junio de 2008.

- 5 Específicamente, se construyó un plásmido TPIV® que codifica secuencias de ARNip efectivas contra Stat3, mediante clonación por PCR de un plásmido Stat3 adquirido de Origene Technologies (Rockville, MD, Estados Unidos) utilizando los siguientes cebadores:

TPIV-Stat3 (inserción de 300 bp)

Cebadores:

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

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

El plásmido de control se construye utilizando un plásmido pGL2 adquirido de Promega (Madison, WI, Estados Unidos).

TPIV-GL2 (inserción de 300 bp)

- 15 Cebadores:

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

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

- 20 Las bacterias de E. coli BL21 (DE3) pLYSe químicamente competentes (50~100 µl) se transformaron con un control o 100 ng de plásmido TPIV® dirigido a Stat3 según las instrucciones del fabricante (Stratagene). Luego se inoculó una única colonia en medio BHI que contenía 100 µg/ml de ampicilina y se cultivó durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se diluyeron 5 ml de cada cultivo durante la noche a 1:40 en medio BHI fresco que contenía 100 µg/ml de ampicilina y se cultivaron durante otras 2-4 horas (hasta el OD₆₀₀ = 0.5). Cada cultivo se trató luego con IPTG (concentración final 1 mM) durante 2 a 4 horas para inducir la transcripción de los ARN de doble cadena largos que se procesarían en un ARNip de cóctel por las bacterias. Después de la inducción de IPTG, el número total de bacterias en cada cultivo se calculó midiendo el valor de OD₆₀₀ (8x10⁸ bacterias/ml de cultivo tiene un OD₆₀₀ = 1). El número de bacterias para el tratamiento celular se calculó de acuerdo con la confluencia celular y la multiplicidad necesaria de infección (MOI; rangos de prueba de 20:1 a 2000:1, bacterias a células) en un volumen de reacción apropiado. Como regla general, el volumen de reacción debe elegirse para dar como resultado 3x10⁹/ml para una MOI de 1000:1. El volumen requerido de cultivo de bacterias se centrifugó luego a 2500 g durante 10 minutos a 4°C y el sedimento se lavó una vez con medio de cultivo libre de suero que se usó para las células que se estaban bactoefectando más 100 µg/ml de ampicilina y 1 mM de IPTG y resuspendido en el mismo medio a la densidad requerida para la infección bacteriana (bactofección).

- 30 Al mismo tiempo, se aislaron células cancerosas o células madre cancerosas. A 30 minutos antes de la bactoefección, el medio de cultivo celular se reemplazó con 2 ml de medio fresco sin suero que contenía 100 µg/ml de ampicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias preparadas anteriormente se agregaron a las células a la MOI deseada durante 2 horas a 37°C.

- 35 Después del período de infección, las células se lavaron 3 veces utilizando medio de cultivo celular libre de suero. Luego, las células se incubaron con 2 ml de medio de cultivo celular completo fresco que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 150 µg/ml de gentamicina durante 2 horas para matar cualquier bacteria extracelular restante. Después del tratamiento con ampicilina y gentamicina, las células se incubaron con 3 ml de medio RPMI 1640 completo nuevo que contenía 10 µg/ml de ofloxacin para matar cualquier bacteria intracelular. Las células se recolectaron o se analizaron en diversos puntos temporales para evaluar el alcance del silenciamiento del gen diana y los fenotipos resultantes.

- 40 En evaluaciones de vida: También se realizaron exámenes diarios del estado de salud de cada animal. Los pesos corporales se verificaron cada tres días. Los alimentos y el agua se suministraban diariamente de acuerdo con los procedimientos de cría de animales de la instalación. El tratamiento que produjo >20% de letalidad y >20% de pérdida de peso corporal neto se consideró tóxico. Los resultados se expresan como volumen tumoral medio (mm³) ± SE. Los valores de p <0.05 se consideran estadísticamente relevantes.

- 45 Cría de animales: Ratones desnudos atómicos machos o hembras de 4-5 semanas (Charles River Laboratories, Wilmington, MA.), se aclimataron a la instalación de alojamiento de animales durante al menos 1 semana antes del inicio del estudio. Todos los procedimientos experimentales utilizados fueron consistentes con las pautas descritas por la American Physiology Society y la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals y también fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee de Boston Biomedical Inc. Los animales fueron alojados en grupos de cuatro en jaulas con lechos de madera en una habitación con temperatura controlada (68°F-72°F), luz (ciclo de luz-

oscuridad de 12 h) y humedad (45-55%). A los animales se les permitió el libre acceso a agua y comida durante el experimento.

5 Sistema de modelo de ratón desnudo intrabazo (modelo ISMS): Se anestesiaron ratones hembra desnudos y, en condiciones asépticas, se realizó una incisión en el flanco izquierdo para exponer el bazo. Se inyectó un millón de células HT29 de cáncer de colon humano en 0.1 ml de PBS bajo la cápsula del bazo utilizando una aguja de calibre 27. Se recolocó el bazo en la cavidad peritoneal y se cerró la incisión. El tratamiento comenzó al día siguiente después de la implantación hasta el día del examen. El régimen de los tratamientos es 5 qd/semana vía i.p. Los ratones se sacrificaron cuando estaban moribundos o 30 días después de la inyección. Se extirparon y examinaron el bazo y el hígado, y se registró el número de lesiones tumorales.

10 Ejemplo 1

Identificación de Stat3 como un objetivo de células madre anticáncer

15 La anulación de Stat3 en CSC induce apoptosis. Para determinar si las células madre de cáncer expresaron Stat3 y si Stat3 fue constitutivamente activo, se realizó microscopía de inmunofluorescencia, que permite no solo el análisis de poblaciones de células raras, sino que también brinda información adicional sobre la localización de proteínas y la capacidad de correlacionar la tinción con el fenotipo (es decir, apoptosis). Después de la detección inmunofluorescente de p-Stat3 y Stat3 en células NSP y SP aisladas por FACS de células de cáncer de colon SW480, determinamos que Stat3 estaba efectivamente presente en células SP y que estaba modestamente enriquecido en el núcleo (Figura 3A). Además, también se observó un aumento en la tinción de p-Stat3 en células SP sobre células NSP, lo que sugiere que las células SP pueden depender más de Stat3 para sobrevivir.

20 El estado de Stat3 también se evaluó en células CD133⁺ aisladas de células de cáncer de cabeza y cuello humanas FaDu y células de glioblastoma humano LN18. Como se muestra en la Figura 3B, Stat3 también es constitutivamente activo en estas células. En conjunto, estos datos sugieren que Stat3 es un objetivo particularmente importante para las células madre de cáncer.

25 A continuación, se probó el efecto de la anulación de Stat3 en CSC utilizando TPIV[®]. El análisis de inmunofluorescencia reveló que se podría lograr un agotamiento significativo de Stat3 dentro de las 24 horas posteriores a la infección (Figura 4A) en CSC (SP) recién aisladas y se encontró que la mayoría de las células tratadas con plásmidos TPIV[®] dirigidos a Stat3 se sometieron a apoptosis dentro de las 24 horas de la infección mientras que los plásmidos TPIV[®] de control no indujeron la apoptosis a niveles por encima de células no infectadas de control (Figura 4B). Estos datos demuestran que las células madre de cáncer dependen de Stat3 para sobrevivir.

30 La anulación de Stat3 en CSCs inhibe la esferogénesis de CSC. Las células madre cancerosas de la población lateral CD44^{alto}/CD24^{bajo} FaDu o Hoeschst se aislaron mediante FACS y se cultivaron en placas de fijación ultrabajas en medio de células madre cancerosas (DMEM/F12, suplemento Neurobasal B27, 20 ng/mL EGF, 10 ng/mL FGF, 4 µg/mL de insulina, y 0.4% de BSA) para permitir la formación de esferas. Las esferas primarias se recolectaron, se desagregaron con tripsina y se distribuyeron a placas de fijación ultrabajas de 96 pozos antes del tratamiento con TPIV[®]. Las bacterias se administraron a una MOI de 1000 durante dos horas antes de la adición del cóctel antibiótico (penstrep, gentamicina, oflaxacina). La formación de la esfera se evaluó después de 10-14 días en cultivo. Las imágenes representativas de la esfera se capturaron antes (Figura 5, paneles superiores izquierdos) o después de la adición de azul de tripano para identificar las células muertas (Figura 5, panel inferior izquierdo). La esferogénesis relativa se mostró en el panel derecho de la Figura 5. Los datos mostraron claramente que la eliminación de Stat3 en las células madre de cáncer inhibe la esferogénesis, lo que demuestra que Stat3 es un factor clave de autorrenovación de las células madre de cáncer.

35 Ejemplo 2

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

45 Inhibición de la actividad de transcripción de Stat3. Los compuestos se probaron para determinar su capacidad para inhibir la actividad de activación de la transcripción de Stat3 en células utilizando un constructo informador de Stat3-luciferasa (Stat3-luc). Las células transfectadas con Stat3-luc se cultivaron en medio de suero reducido antes de la adición del compuesto indicado durante 30 minutos. Luego, las células se estimularon con 25 ng/ml de oncostatina M (OSM) durante 6 horas, seguida de la detección de la actividad informadora Stat3-luc. La incubación de células con el compuesto 401 inhibió la actividad del indicador Stat3 estimulada por OSM (Figura 6, panel izquierdo). AG490, un inhibidor conocido de la vía de Jak-Stat, se incluyó como control positivo para la inhibición de Stat3. El etopósido, incluido como control de la actividad genotóxica, mostró poca o ninguna inhibición de Stat3. El compuesto 1001, que es naftaleno en lugar de naftoquinona como los compuestos en esta descripción, no inhibió la actividad del indicador Stat3 estimulada por OSM incluso a una concentración mucho más alta (Figura 6, panel derecho).

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

Tabla 3

Compuesto #	IC ₅₀ en los ensayos Stat3-Luc
401	~0.25 μ M
416	~0.75 μ M
418	~0.75 μ M
301	~2 μ M

5 Inhibición de la actividad de unión al ADN de Stat3. Se utilizaron extractos nucleares de células HeLa, que contienen Stat3 activada de forma constitutiva detectada por la fosforilación en el residuo de tirosina 705, para realizar los EMSA de Stat3 para controlar la actividad de unión al ADN de Stat3. Los extractos nucleares se incubaron con el compuesto indicado antes de la incubación con el oligonucleótido Stat3 consenso marcado con IR700. La unión de Stat3 al oligonucleótido se controló mediante electroforesis en gel y detección utilizando un escáner infrarrojo LiCor Odyssey. La banda retardada de Stat3 se identificó y confirmó mediante superdesplazamiento con el anticuerpo anti-Stat3 (Figura 7A, panel izquierdo) y la inhibición dependiente de la dosis con el péptido Stat3 (Figura 7A, panel central). La inhibición dependiente de la dosis de la unión del ADN de Stat3 se observó después de la incubación de la sonda marcada con el compuesto 401 (Figura 7A, panel derecho).

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

15 Inhibición de los efectores descendentes de Stat3 en tejidos de tumores de xenoinjerto. Los extractos se prepararon a partir de tumores de Paca2 xenoinjertados que se trataron con el compuesto 401 o el control de vehículo 4 horas antes de la recolección. Las muestras se analizaron mediante transferencias de Western y EMSA para evaluar el nivel de expresión del efector descendente de Stat3 y la actividad de unión al ADN de Stat3. La muestra tratada con el compuesto 401 (T) mostró una disminución en la actividad de unión al ADN de Stat3 sobre el control (V) (Figura 8A). Además, el tratamiento con el compuesto 401 resultó en una disminución en el nivel de expresión de los efectores corriente abajo de Stat3 ciclina D1 y survivina (Figura 8B).

Ejemplo 3

Identificación de compuestos que atacan a las células madre de cáncer

25 Identificación de compuestos que son apoptóticos a células madre cancerosas. Dado que se ha demostrado que las células madre de cáncer expulsan activamente a Hoechst, las células SW480 se tiñeron con Hoechst y la población lateral (que se muestra en la Figura 9A, área cerrada del panel izquierdo) se clasificó para enriquecer las células madre de cáncer. Para confirmar que esta población lateral está enriquecida con células madre cancerosas, un conjunto de control de células SW480 se trató primero con Verapamil, un inhibidor de los transportadores ABC, antes de teñir con Hoechst. Como se muestra en el panel derecho de la Figura 9A, el tratamiento con verapamilo resulta en la pérdida de la población lateral.

30 Se accedió a la IC₅₀ del compuesto 401 contra la población lateral de Hoechst en ensayos de MTT y se comparó con la IC₅₀ frente a la población no lateral. Los resultados muestran que la población lateral es tan sensible como la población no lateral al compuesto 401 (Figura 9B, paneles de la derecha). Sin embargo, la población lateral es mucho más resistente que la población no lateral a la doxorubicina (Figura 9B, paneles de la izquierda), lo que concuerda con publicaciones anteriores [7, 86]. Estos datos sugieren que el compuesto 401 mata las células madre de cáncer.

35 Las células de la población lateral de Hoechst se trataron con el compuesto 401 y se accedió al modo de muerte celular mediante tinción con Anexina V (un marcador temprano para la apoptosis). Los resultados muestran que las células moribundas son anexina V positivas (Figura 10A), lo que demuestra que el compuesto 401 es apoptótico a las células madre cancerosas.

40 Como alternativa, realizamos CD133 (uno de los marcadores de superficie de células madre de cáncer comunes), descensos de perlas magnéticas para enriquecer las células madre de cáncer. Las células CD133⁺ se trataron luego con el compuesto 401 seguido por tinción con anticuerpo contra la Caspasa 3 escindida (un sello de la apoptosis). Como se muestra en la Figura 10B, muchas de las células CD133⁺ se vuelven positivas a Caspasa 3 escindida después del tratamiento con el compuesto 401, lo que corrobora que el compuesto 401 es apoptótico a las células madre cancerosas.

Además, se probaron las actividades de varios otros compuestos contra las células madre de cáncer. En resumen, se expusieron CSC recién aisladas (células SW480 Hoechst SP o CD44^{alta} con células FaDu) a un rango de dosis (30-0.117 μM) de compuesto durante 48 h antes de examinar la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. Las IC₅₀ se estimaron trazando el porcentaje de células supervivientes. Como se muestra en la Tabla 4 y la Tabla 5, los compuestos de la presente divulgación pueden dirigirse a las células madre de cáncer.

Tabla 4

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	
	NSP	SP
401	0.33	0.34
418	0.33	0.34
4011	0.34	0.38
4012	0.81	0.57

Tabla 5

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	
	CD44 ^{baja}	CD44 ^{alta}
4011	0.42	0.27
4012	0.76	1.05

10 Identificación de compuestos que inhiben la esferogénesis de CSC *in vitro*. Una de las características distintivas de las células madre de cáncer es su capacidad de autorrenovación [87]. Un método confiable para medir la capacidad de autorrenovación de las poblaciones celulares es la capacidad de ser cultivadas como esferas en ausencia de suero o unión [88]. Para comparar la capacidad del compuesto 401 con otros agentes dirigidos y quimioterapéuticos, las CSC CD44^{alta} aisladas con FACS se cultivaron como esferas durante 72 horas antes de ser atacadas con un panel
15 de agentes terapéuticos. De los agentes probados, solo el compuesto 401 fue eficaz para prevenir la proliferación de esferas (Figura 11). Tenga en cuenta que las esferas fueron resistentes a la doxorubicina y al docetaxel a pesar de que se aplicaron aproximadamente diez veces sus concentraciones de IC₅₀ para la muerte celular en ensayos similares. Se agregaron Tarceva, Sutent y Gleevec aproximadamente a tres veces sus concentraciones terapéuticas reportadas. Esto demuestra que, si bien las células madre de cáncer son resistentes a los agentes quimioterapéuticos y dirigidos convencionales, el compuesto 401 es altamente efectivo para inhibir su crecimiento.

Identificación de compuestos que inhiben la esferogénesis de CSC *in vivo*. Se obtuvieron ratones atómicos hembra nu/nu de seis semanas de edad de Charles River Labs (Wilmington, MA). Los ratones se inyectaron por vía subcutánea en el flanco con 6×10^6 células cancerosas FaDu o Paca2 en 0.2 mL de DMEM sin suero. Después de que los xenoinjertos alcanzaron los $\sim 200 \text{ mm}^3$ de tamaño, los animales que portaban tumores de xenoinjerto Paca2 se administraron con vehículo, gemcitabina (120 mg/kg, dos veces por semana) o compuesto 401 (20 mg/kg) por ip durante una semana y animales con FaDu los tumores de xenoinjerto se administraron diariamente con vehículo, carboplatino (30 mg/kg) o compuesto 401 (20 mg/kg) por vía ip durante dos semanas antes del sacrificio. Luego se recolectaron los tumores para células Paca2 y FaDu, respectivamente. Se obtuvieron suspensiones de células individuales después del sacrificio del animal y la eliminación estéril de tumores. En resumen, los tumores se trituraron con bisturíes estériles en piezas de 0.1 mm^3 antes de ser digeridos en 1 mg/ml de colagenasa/HBSS durante 15-30 minutos con agitación constante. Después de la etapa a través de un filtro de malla de $40 \mu\text{m}$, se eliminaron los glóbulos rojos, las células muertas y los residuos celulares mediante la colocación en capas de la suspensión celular en 1 ml de Histopaque y la capa de interfase de recolección después de la centrifugación a $1440 \times g$ durante 30 minutos. Las células vivas se contaron y se usaron para medir su capacidad para formar esferas. Las células se distribuyeron en placas de 96 pozos de unión ultrabajas a una densidad de 100 células por pozo en medio de células

5 madre cancerosas (DMEM/F12, suplemento de neurobasal B27, 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF, 4 µg/ml de insulina, y 0.4% BSA). Se añadieron medios nuevos cada tres días y se determinó la formación de la esfera después de 10-14 días de cultivo. Se puntuaron esferas con >50 células. Al final del experimento, se añadió azul tripán para identificar las células muertas. Como se muestra en la Figura 12, las quimioterapias estándar gemcitabina (panel superior) y carboplatino (panel inferior) enriquecieron a las células madre de cáncer evidenciadas por el aumento de la esferogénesis. En contraste, los tratamientos con el compuesto 401 disminuyeron las células madre de cáncer evidenciadas por la disminución de la esferogénesis.

Ejemplo 4

Identificación de compuestos que matan selectivamente un amplio espectro de células cancerosas

10 Identificación de compuestos que son apoptóticos para un amplio espectro de células cancerosas *in vitro*. Las células colocadas en placas de 96 pozos y tratadas con los compuestos indicados se sometieron a análisis de MTT a las 24 horas después del tratamiento con el compuesto para determinar la viabilidad celular. Los valores de IC₅₀ calculados a través de múltiples líneas celulares se resumen en la Tabla 6 a continuación. Los datos demuestran que estos compuestos tienen una potente actividad contra un amplio espectro de células cancerosas.

15 Tabla 6

Línea celular	Tejido	IC ₅₀ (µM)						
		4011	4012	101	301	401	416	418
A549	Pulmón					0.95	1.90	1.06
H1299	Pulmón			3-10	0.794	0.23	0.25	0.34
MCF7	Mama					0.46	0.75	0.46
HeLa	Cérvix			11.7	3.358	0.43	0.62	0.80
DLD1	Colon					0.33	0.54	0.64
SW480	Colon					0.32	0.44	0.76
HCT116	Colon					0.58	0.69	0.61
HT29	Colon					1.27	1.91	1.83
HepG2	Hígado					0.25		
Paca2	Páncreas	0.446				0.11	0.21	0.21
Panel	Páncreas					1.70	2.59	1.54
DU145	Próstata			3.7	0.835	0.12	0.22	0.18
PC3	Próstata					2.37	3.10	3.04
LNCap	Próstata					0.63		
FaDu	Cabeza y cuello	0.353	1.041			0.39		

Además, las células DU145 se trataron primero con DMSO o las concentraciones indicadas del compuesto 401, luego se tiñeron con Anexina V y se siguieron con un análisis de citometría de flujo 5 horas después del tratamiento. Los

resultados muestran que el tratamiento con 401 resulta en un aumento dependiente de la dosis en la tinción con anexina V (Figura 13), lo que demuestra que el compuesto 401 es apoptótico a estas células cancerosas.

5 Ejemplos de la selectividad de los compuestos. En condiciones de ensayo que resultan en la muerte de prácticamente todas las células cancerosas, las células normales permanecen sustancialmente viables. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron relativamente resistentes al compuesto 401, con un IC₅₀ de MTT de 14 μM después de una incubación de 24 horas con el compuesto 401. Este IC₅₀ es entre 6 a 116 veces mayor que los observados en una variedad de líneas células cancerosas, lo que indica una ventana terapéutica razonable en comparación con las células cancerosas.

10 De forma similar a los PMBC, las células madre hematopoyéticas de médula ósea CD34⁺ se salvaron cuando se trataron con el compuesto 401. Como se muestra en la Tabla 7, la incubación de células mononucleares de médula ósea CD34⁺ durante 6 horas con el compuesto 401 dio como resultado un IC₅₀ mayor que 30 μM tanto para la línea ósea de la médula ósea como para los linajes mieloides, mientras que las células de cáncer de próstata DU145 y de colon HT29 tienen IC₅₀ menor a 0.5 μM en condiciones similares. Estos datos sugieren una amplia ventana terapéutica (más de 50 veces) para el compuesto 401 de acuerdo con los datos *in vitro*.

15 Tabla 7. El compuesto 401 es relativamente no tóxico para las células madre de médula ósea CD34⁺

Compuesto 401 IC ₅₀ (μM)			
Células Normales		Células cancerígenas	
CD34 ⁺ BM Eritroide	CD34 ⁺ BM Mieloide	DU145	HT29
>30	>30	<0.2	<0.5
BM = médula ósea			
Comparación de la IC ₅₀ del compuesto 401 en células mononucleares de médula ósea CD34 ⁺ , células DU145 y células FaDu en ensayos de formación de colonias.			

Ejemplo 5

Eficacia antitumoral *in vivo*

20 Modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático. Se inocularon células Paca-2 por vía subcutánea en ratones atímicos hembra (4x10⁶ células/ratón). Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 450 mm³, los animales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos con cinco ratones por grupo. Los ratones se trataron por vía intraperitoneal con cualquiera de los compuestos 401 a 20 mg/kg o con el control de vehículo diariamente. El compuesto 401 se formuló a 5 mg/ml en lípidos al 1.5% y H₂O. Los animales recibieron un total de 14 dosis y se dejaron para la observación posterior al tratamiento. Los tumores se midieron durante todo el tratamiento y se monitorizaron durante otros 22 días después del tratamiento. Como se muestra en el panel izquierdo de la Figura 14, el compuesto 401 inhibió potentemente el crecimiento del tumor. Se calculó que la inhibición del crecimiento tumoral era del 64% en el día 60 y fue estadísticamente significativa (p<0.001). Más importante aún, los volúmenes de tumores permanecieron estáticos durante los 22 días posteriores al tratamiento.

30 En un experimento similar, las células de cáncer pancreático humano panc-1 se inocularon por vía subcutánea en ratones atímicos hembra desnudos (2x10⁶ células/ratón) y se les permitió formar tumores palpables. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 60 mm³, los animales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos con 5 ratones por grupo. Los ratones se trataron por vía intraperitoneal (ip) con gemcitabina con un régimen estándar (120 mg/kg una vez cada tres días) o control con vehículo, para un total de 6 dosis de control con gemcitabina o vehículo. Los tumores se midieron durante todo el tratamiento y se monitorizaron durante otros 19 días después del tratamiento. Como se muestra en el panel derecho de la Figura 14, el tratamiento con gemcitabina como monoterapia inhibió el crecimiento tumoral con una inhibición del crecimiento tumoral del 47.5% en el día 41. Después de interrumpir el tratamiento, los tumores en el grupo tratado con gemcitabina pronto superaron a los del grupo de control.

40 No se observó ningún rebrote tumoral durante el tratamiento del compuesto 401 o el período posterior al tratamiento en el modelo de cáncer pancreático humano Paca-2 xenoinjertado, que es consistente con su mecanismo de acción de direccionamiento de células madre cancerosas. En contraste, los tumores de xenoinjerto pancreático humanos tratados con la quimioterapia estándar actual con gemcitabina respondieron inicialmente, pero se recuperaron durante el tratamiento continuo o superaron los tumores de control después de que se detuvo la dosificación. La abolición del

rebote tumoral diferencia el compuesto 401 de las quimioterapias estándar, lo que ofrece la posibilidad de mejorar la terapia contra el cáncer de manera drástica y fundamental.

5 Modelo de xenoinjerto de cáncer de cabeza y cuello. Se inocularon células de cáncer de cabeza y cuello humanas FaDu por vía subcutánea en ratones atímicos hembra (6×10^6 células/ratón) y se les permitió formar tumores palpables. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 , los animales se trataron por vía intraperitoneal (ip) con el compuesto 401 a 20 mg/kg o el control de vehículo diariamente (5 días consecutivos, seguido de un receso de dosificación de 2 días). El compuesto 401 se formuló a 5 mg/ml en 2% de lípidos, 0.1% de colesterol y H_2O . Los animales recibieron un total de 15 dosis de compuesto 401 o control de vehículo. Los tumores se midieron a lo largo del tratamiento. Como se muestra en la Figura 15 en este modelo altamente agresivo de xenoinjerto de cabeza y 10 cuello, los animales a los que se les administró el compuesto 401 por vía intraperitoneal como monoterapia inhibieron de manera potente el crecimiento del tumor. La inhibición del crecimiento tumoral del compuesto 401 se calculó que era del 75% con un valor de p de 0.007. No hubo cambios significativos en el peso corporal debido a la administración intraperitoneal del vehículo o compuesto 401 a 20 mg/kg .

15 Modelo de xenoinjerto de cáncer de mama. Las células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se inocularon por vía subcutánea en ratones atímicos hembra (8×10^6 células/ratón) y se les permitió formar tumores palpables. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 200 mm^3 , los animales se trataron por vía oral (po) con el compuesto 401 a 200 mg/kg o el control de vehículo diariamente (5 días consecutivos, seguido de un receso de dosificación de 2 días). El compuesto 401 se formuló a 20 mg/ml en gelucire al 8% y vitamina E al 20%. Los animales recibieron un total de 15 dosis de compuesto 401 o control de vehículo. Los tumores se midieron a lo largo del tratamiento. Como se muestra en la Figura 16, la dosificación oral del compuesto 401 en monoterapia a 200 mg/kg inhibió potentemente el crecimiento del tumor. La inhibición óptima del crecimiento tumoral del compuesto 401 se calculó en un 66% con un valor de p de 0.0068. No hubo cambios significativos en el peso corporal debido a la administración p.o. del vehículo o compuesto 401 a 200 mg/kg . Estos datos sugieren que el compuesto 401 se puede administrar de manera segura en un régimen que es eficaz en este modelo de cáncer de mama humano.

25 Modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata. Las células de cáncer de próstata humano PC3 se inocularon por vía subcutánea en ratones atímicos hembra (8×10^6 células/ratón) y se permitió la formación de tumores palpables. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 , los animales se trataron por vía intraperitoneal (ip) con el compuesto 401 a 20 mg/kg o el control de vehículo diariamente. El compuesto 401 se formuló a 5 mg/ml en 2% de lípidos, 0.1% de colesterol y H_2O . Los animales recibieron un total de 30 dosis de compuesto 401 o control de vehículo. 30 Los tumores se midieron a lo largo del tratamiento. Como se muestra en la Figura 17, la dosificación ip del compuesto 401 en monoterapia a 20 mg/kg inhibió el crecimiento del tumor. Se calculó que la inhibición óptima del crecimiento tumoral del compuesto 401 era del 55% con un valor de p de 0.015. No hubo cambios significativos en el peso corporal debido a la administración ip del vehículo o compuesto 401 a 20 mg/kg . Estos datos sugieren que el compuesto 401 se puede dosificar de manera segura en un régimen que sea efectivo en este modelo de cáncer de próstata humano.

35 Modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico. Se inocularon células cancerosas gástricas humanas MKN-45 por vía subcutánea en ratones atímicos hembra (8×10^6 células/ratón) y se les permitió formar tumores palpables. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 180 mm^3 , los animales se administraron por vía oral (p.o.) con el compuesto 401 a 200 mg/kg o el control de vehículo a diario. El compuesto 401 se formuló a 20 mg/ml en gelucire al 8% y vitamina E al 20%. Los animales recibieron un total de 20 dosis de compuesto 401 o control de vehículo. Los tumores se 40 midieron a lo largo del tratamiento. Como se muestra en la Figura 18, la dosis oral del compuesto 401 en monoterapia a 200 mg/kg inhibió el crecimiento del tumor. La inhibición óptima del crecimiento tumoral del compuesto 401 se calculó en un 70% con un valor de p de 0.01. No hubo cambios significativos en el peso corporal debido a la administración oral del vehículo o compuesto 401 a 200 mg/kg . Estos datos sugieren que el compuesto 401 se puede dosificar de manera segura en un régimen que es eficaz en este modelo de cáncer gástrico humano.

45 Modelo de xenoinjerto de cáncer de hígado. Se inocularon células de cáncer de hígado humano HepG2 por vía subcutánea en ratones atímicos hembra (8×10^6 células/ratón) y se les permitió formar tumores palpables. En este estudio, la dosificación comenzó cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 700 mm^3 . Los animales se trataron por vía intravenosa (iv) con el compuesto 401 a 10 mg/kg o el control de vehículo diariamente. El compuesto 401 se formuló a 2 mg/ml en albúmina al 1.5%. Los animales recibieron un total de 10 dosis de compuesto 401 o control de 50 vehículo. Los tumores se midieron a lo largo del tratamiento. Como se muestra en la Figura 19, a pesar de que el tratamiento comenzó en una etapa muy posterior del crecimiento del tumor, el tratamiento iv con el compuesto 401 en monoterapia a 10 mg/kg todavía inhibió potencialmente el crecimiento del tumor. La inhibición óptima del crecimiento tumoral del compuesto 401 se calculó en un 52.3% con un valor de p de 0.05. No hubo cambios significativos en el peso corporal debido a la administración iv del vehículo o compuesto 401 a 10 mg/kg . Estos datos sugieren que el 55 compuesto 401 se puede dosificar de manera segura en un régimen que es eficaz en este modelo de cáncer de hígado humano.

Ejemplo 6

Eficacia antimetástasis

5 El compuesto 401 también se probó en cuanto a su capacidad para inhibir la metástasis en el modelo ISMS. El sistema de modelo de ratón intrabazo-desnudo (modelo ISMS) es apropiado para estudios del comportamiento maligno de los carcinomas colorrectales, ya que esta técnica puede producir metástasis experimentales en el hígado. En este modelo, un millón de células HT29 en 0.1 ml de PBS se inyectaron bajo la cápsula de bazo de los ratones desnudos. Se reemplazó el bazo en la cavidad peritoneal y se cerró la incisión. Los ratones se sacrificaron cuando estaban moribundos o 30 días después de la inyección. Se extirparon y examinaron el bazo y el hígado, y se registró el número de lesiones tumorales. Los ratones se dividieron en 2 grupos, un grupo de control de vehículo dado (n=4) y el otro grupo que recibió 20 mg/kg de compuesto 401 (n=4). El fármaco se administró vía ip. 5 días/semana desde el día 2 hasta el día 30 después de la inyección i.s. Los números de tumores primarios y tumores metastásicos del hígado se estimaron microscópicamente. Las imágenes representativas se muestran en la Figura 20. En el grupo de control de vehículo, había una gran carga de tumores primarios en el bazo (Figura 20, panel superior izquierdo). También se observaron metástasis hepáticas masivas espontáneas (Figura 20, panel superior derecho). Los tratamientos con el compuesto 401 reducen significativamente el número de focos de tumores primarios y la metástasis hepática espontánea (Figura 20, paneles inferiores).

15 **Ejemplo 7**

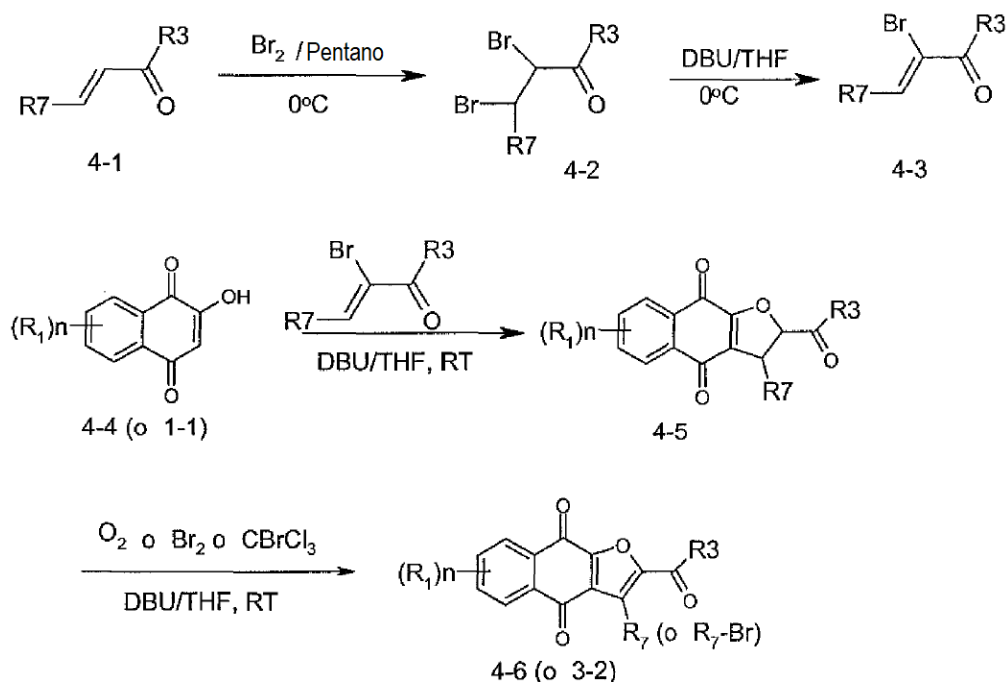
Farmacocinética y perfil de toxicidad.

20 Se realizó un análisis farmacocinético del compuesto 401 en ratas. Se dosificaron ratas Sprague Dawley hembras para la evaluación farmacocinética (9 ratas/grupo) mediante sonda oral. El volumen de dosis fue de 10 ml/kg y cada grupo recibió preparaciones que contenían el artículo de control (9% Gelucire 44/14 y 18% de vitamina E TPGS en agua estéril) o 10 o 30 mg/kg/día de compuesto 401 en el artículo de control. Las muestras de sangre se tomaron de 3 animales/sexo/punto de tiempo predosis y aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas después de la dosis inicial. El plasma se recogió por centrifugación y se almacenó en un congelador para mantenerlo a $-75^{\circ}\text{C} \pm 15^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis. La parte bioanalítica de este estudio se realizó utilizando un método validado de LC/MS/MS. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) fue de 10.0 ng/mL. Como se muestra en la Figura 21, los datos farmacocinéticos mostraron que el compuesto 401 logró y mantuvo una concentración crítica de hasta 7 μM hasta 8 horas.

A estas dosis, no se observaron efectos tóxicos en ratas con dosis continuas durante 28 días. Esto incluyó la observación clínica, las pruebas de laboratorio, los resultados brutos e histológicos. Juntos, estos datos demostraron que el compuesto 401 puede lograr la exposición deseada a la PK para la actividad anticancerígena selectiva.

Ejemplo 8

Esquema 1



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

THF: Tetrahidrofurano;

RT: Temperatura ambiente.

Preparación de 2-Acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona (compuesto de fórmula 4-6 en donde R1 = R7 = H y R3 = -CH₃)

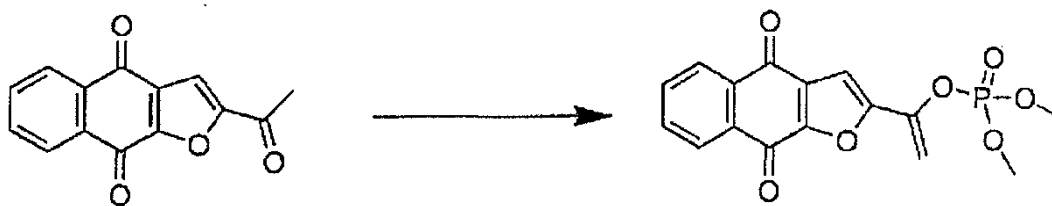
Preparación de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona (compuesto de fórmula 4-6 en donde R1 = R7 = H y R3 = -CH₃)

- 5 A una solución de 18.8 gramos (22 ml, 0.268 moles) de 3-buten-2-ona (Fórmula 4-1 en el esquema 1) en 200 ml de pentano en baño de hielo con agitación vigorosa, se agregaron lentamente 39.0 gramos (12.54 ml, 0.244 moles) de bromo en 50 ml de pentano durante 30 minutos. Después de agitar durante 5 minutos adicionales en un baño de hielo, la mezcla se evaporó para eliminar la mayor parte del pentano. El pequeño volumen de residuo de 3,4-dibromo-2-butanona (4-2) de la etapa 1 se disolvió en 400 ml de THF y luego se enfrió en un baño de hielo. A la solución en baño de hielo con agitación vigorosa, se agregaron lentamente 37.2 gramos (36.5 ml, 0.244 moles) de DBU en 50 ml de THF en 30 minutos. Se generó gran cantidad de sal precipitada. La mezcla se usó directamente para la siguiente etapa de reacción. A la mezcla de reacción de 3-bromo-3-buten-2-ona (4-3), se agregaron 38.5 gramos (0.220 moles) de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (4-4). La mezcla resultante se agitó vigorosamente en un baño de agua a temperatura ambiente. Luego se agregaron lentamente a la mezcla 44.6 gramos (43.8 ml, 0.293 moles) de DBU dentro de los 30 minutos. La temperatura de la mezcla de reacción aumentó por el calor generado por la reacción y se controló a menos de 35°C agregando hielo al baño de agua. Después de agitarse vigorosamente durante 3 horas adicionales al aire libre a temperatura ambiente, se agregaron 1.800 ml de agua a la mezcla. La mezcla resultante se enfrió a 0°C y luego se filtró. El sólido filtrado se lavó sucesivamente con 500 ml de agua, 500 ml de bicarbonato de sodio acuoso al 5%, 500 ml de ácido acético al 1% y 250 ml de acetona enfriada con hielo. El sólido lavado se recrystalizó en 200 ml de ácido fórmico para producir 12 gramos de producto con un rendimiento total de 22.8% para el Compuesto 4-6 o 3-2 (R1 = H, R3 = CH₃, R7 = H) ¹H RMN (en CDCl₃) δ 2.67 (s, 3H), 7.61 (s, 1H-3), 7.79-7.84 (m, 2H), 8.22-8.28 (m, 2H).
- 10
- 15
- 20

Ejemplo 9

Esquema 2

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

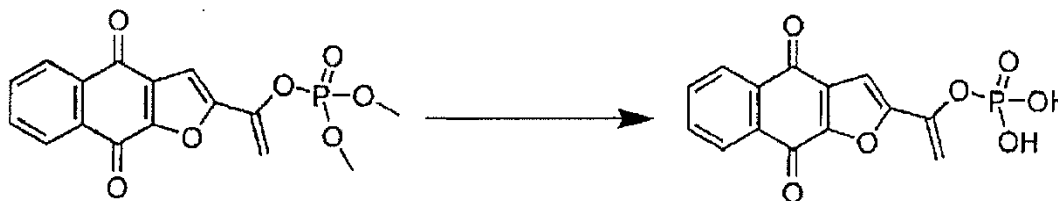


A una solución de BBI6002 (240 mg, 1 mmol) en 50 THF a -78°C se le añadió una solución de bis(trimetilsilil)amida de litio (1.0M en THF, 1.2 mL). Después de agitarse a esta temperatura durante 1 hora, la mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 30 min. Luego se añadió una solución de clorofosfato de dimetilo (217 mg, 1.5 mmol) en 5 mL de THF a esta mezcla a -78°C . La mezcla resultante se agitó y se dejó calentar a temperatura ambiente lentamente. Después de 1 h de agitación a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó, el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 , se lavó con NH_4Cl saturado y agua y se secó sobre MgSO_4 . La evaporación del disolvente produjo la mezcla de reacción cruda, que se purificó a partir de cromatografía en columna para producir 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico como un sólido amarillo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8.20 - 8.28 (m, 2H), 7.78 - 7.82 (m, 2H), 7.07 (s, 1H), 5.78 (t, 1H, $J = 2.8$ Hz), 5.50 (t, 1H, $J = 2.8$ Hz), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H); MS m/z 347.20 (M-H).

Ejemplo 10

Esquema 3

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



A una solución de 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico (40 mg, 0.114 mmol) en CH_2Cl_2 (2 mL) a temperatura ambiente se añadió bromuro de trimetilsililo (71 mg, 0.46 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y luego se concentró al vacío. El residuo se purificó por HPLC semipreparativa para obtener el producto mono-[1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico como un sólido amarillo. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.98 - 8.02 (m, 2H), 7.57 - 7.62 (m, 2H), 6.92 (s, 1H), 5.54 (t, 1H, $J = 2.8$ Hz), 5.36 (t, 1H, $J = 2.8$ Hz); MS m/z 319.20 (M-H).

Todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, resultados analíticos, etc., utilizados en la especificación y las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la especificación y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener mediante la presente divulgación. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse a la luz del número de dígitos significativos y los enfoques de redondeo ordinarios.

Las modificaciones y variaciones de esta invención pueden realizarse sin apartarse de su alcance, como será evidente para los expertos en la materia. Las realizaciones específicas descritas en este documento se ofrecen solo a modo de ejemplo y no pretenden ser limitativas de ninguna manera. Se pretende que la especificación y los ejemplos se consideren solo como ejemplos, con un verdadero alcance de la invención indicado en las reivindicaciones que siguen más adelante.

Referencias:

1. Bonnet, D., Normal and leukaemic stem cells. *Br J Haematol*, 2005.130(4): p. 469-79.
2. Bonnet, D. and J.E. Dick, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 1997. 3(7): p. 730-7.
3. Hambardzumyan, D., M. Squatrito, and E.C. Holland, Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. *Cáncer Cell*, 2006. 10(6): p. 454-6.
4. Baumann, M., M. Krause, and R. Hill, Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cáncer*, 2008. 8(7): p. 545-54.
5. Ailles, L.E. and I.L. Weissman, Cáncer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol*, 2007.18(5): p. 460-6.

6. Jones, R.J., W.H. Matsui, and B.D. Smith, Cancer stem cells: are we missing the target? *J Natl Cancer Inst*, 2004. 96(8): p. 583-5.
7. Ho, M.M., et al., Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res*, 2007. 67(10): p. 4827-33,
- 5 8. Wang, J., et al., Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res*, 2007. 67(8): p. 3716-24.
9. Haraguchi, N., et al., Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells*, 2006. 24(3): p. 506-13.
- 10 10. Doyle, L.A. and D.D. Ross, Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, 2003. 22(47): p. 7340-58.
11. Alvi, A.J., et al., Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast Cancer Res*, 2003. 5(1): p. R1-8.
12. Frank, N.Y., et al., ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*, 2005. 65(10): p. 4320-33.
- 15 13. Schatton, T., et al., Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 2008. 451(7176): p. 345-9.
14. Kondo, T., T. Setoguchi, and T. Taga, Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(3): p. 781-6.
15. Goodell, M.A., et al., Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 1996. 183(4): p. 1797-806.
- 20 16. Collins, A.T., et al., Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, 2005. 65(23): p. 10946-51.
17. Li, C., et al., Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 2007. 67(3): p. 1030-7.
18. Ma, S., et al., Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*, 2007.132(7): p. 2542-56.
- 25 19. Prince, M.E., et al., Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007.104(3): p. 973-8.
20. Ricci-Vitiani, L., et al., Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 2007. 445(7123): p. 111-5.
- 30 21. Singh, S.K., et al., Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003. 63(18): p. 5821-8.
22. Dalerba, P., et al., Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(24): p. 10158-63.
23. Yu, H. Stat3: Linking oncogenesis with tumor immune evasion. in *AACR 2008 Annual Meeting*. 2008. San Diego, CA.
- 35 24. Pedrazzini, L., A. Leitch, and J. Bromberg, Stat3 is required for the development of skin cancer. *J Clin Invest*, 2004. 114(5): p. 619-22.
25. Catlett-Falcone, R., et al., Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 1999. 10(1): p. 105-15.
26. Bromberg, J.F., et al., Stat3 as an oncogene. *Cell*, 1999. 98(3): p. 295-303.
- 40 27. Kanda, N., et al., STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene*, 2004. 23(28): p. 4921-9.
28. Schlette, E.J., et al., Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 2004. 22(9): p. 1682-8.
- 45 29. Niu, G., et al., Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 2002. 21(13): p. 2000-8.

30. Xie, T.X., et al., Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene*, 2004. 23(20): p. 3550-60.
31. Kortylewski, M., et al., Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*, 2005. 11(12): p. 1314-21.
- 5 32. Burdelya, L., et al., Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects. *J Immunol*, 2005. 174(7): p. 3925-31.
33. Wang, T., et al., Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*, 2004. 10(1): p. 48-54.
34. Darnell, J.E., Validating Stat3 in cancer therapy. *Nat Med*, 2005. 11(6): p. 595-6.
- 10 35. Zhang, L., et al., Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium carrying plasmid-based small interfering RNAs. *Cancer Res*, 2007. 67(12): p. 5859-64.
36. Campbell, I.L., Cytokine-mediated inflammation, tumorigenesis, and disease-associated JAK/STAT/SOCS signaling circuits in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005. 48(2): p. 166-77.
- 15 37. Harris, T.J., et al., Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol*, 2007. 179(7): p. 4313-7.
38. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002. 105(9): p. 1135-43.
39. Stephens, J.W., et al., A common functional variant in the interleukin-6 gene is associated with increased body mass index in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Mol Genet Metab*, 2004. 82(2): p. 180-6.
- 20 40. Cesari, M., et al., Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation*, 2003. 108(19): p. 2317-22.
41. Orshal, J.M. and R.A. Khalil, Interleukin-6 impairs endothelium-dependent NO-cGMP-mediated relaxation and enhances contraction in systemic vessels of pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. 286(6): p. R1013-23.
42. Manolagas, S.C., Role of cytokines in bone resorption. *Bone*, 1995. 17(2 Suppl): p. 63S-67S.
- 25 43. Yaffe, K., et al., Inflammatory markers and cognition in well-functioning African-American and white elders. *Neurology*, 2003. 61(1): p. 76-80.
44. Watson, C.J. and W.R. Miller, Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer*, 1995. 71(4): p. 840-4.
45. Song, J.I. and J.R. Grandis, STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene*, 2000. 19(21): p. 2489-95.
- 30 46. Song, L., et al., Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene*, 2003. 22(27): p. 4150-65.
47. Savarese, T.M., et al., Coexpression of oncostatin M and its receptors and evidence for STAT3 activation in human ovarian carcinomas. *Cytokine*, 2002. 17(6): p. 324-34.
- 35 48. Toyonaga, T., et al., Blockade of constitutively activated Janus kinase/signal transducer and activator of transcription-3 pathway inhibits growth of human pancreatic cancer. *Cancer Lett*, 2003. 201(1): p. 107-16.
49. Corvinus, F.M., et al., Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia*, 2005. 7(6): p. 545-55.
50. Gao, B., et al., Constitutive activation of JAK-STAT3 signaling by BRCA1 in human prostate cancer cells. *FEBS Lett*, 2001. 488(3): p. 179-84.
- 40 51. Buettner, R., L.B. Mora, and R. Jove, Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(4): p. 945-54.
52. Carson, W.E., Interferon-alpha-induced activation of signal transducer and activator of transcription proteins in malignant melanoma. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(9): p. 2219-28.
53. Chen, C.L., et al., Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers. *Br J Cancer*, 2007. 96(4): p. 591-9.
- 45 54. Lai, R., et al., STAT3 is activated in a subset of the Ewing sarcoma family of tumours. *J Pathol*, 2006. 208(5): p. 624-32.

55. Punjabi, A.S., et al., Persistent activation of STAT3 by latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of endothelial cells. *J Virol*, 2007. 81(5): p. 2449-58.
56. Schaefer, L.K., et al., Constitutive activation of Stat3alpha in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2). *Oncogene*, 2002. 21(13): p. 2058-65.
- 5 57. Puthier, D., R. Bataille, and M. Amiot, IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol*, 1999. 29(12): p. 3945-50.
58. Migone, T.S., et al., Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science*, 1995. 269(5220): p. 79-81.
- 10 59. Spiekermann, K., et al., Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia. *Eur J Haematol*, 2001. 67(2): p. 63-71.
60. Epling-Burnette, P.K., et al., Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest*, 2001. 107(3): p. 351-62.
61. Weber-Nordt, R.M., et al., Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*, 1996. 88(3): p. 809-16.
- 15 62. Sommer, V.H., et al., In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an antiapoptotic function of STAT3. *Leukemia*, 2004. 18(7): p. 1288-95.
63. Lai, R., et al., Signal transducer and activator of transcription-3 activation contributes to high tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Am J Pathol*, 2004. 164(6): p. 2251-8.
- 20 64. Fu, X.Y., STAT3 in immune responses and inflammatory bowel diseases. *Cell Res*, 2006. 16(2): p. 214-9.
65. Feldmann, M., F.M. Brennan, and R.N. Maini, Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, 1996. 14: p. 397-440.
66. Krause, A., et al., Rheumatoid arthritis synoviocyte survival is dependent on Stat3. *J Immunol*, 2002. 169(11): p. 6610-6.
- 25 67. Pfitzner, E., et al., The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des*, 2004. 10(23): p. 2839-50.
68. Lovato, P., et al., Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem*, 2003. 278(19): p. 16777-81.
- 30 69. Ishihara, K. and T. Hirano, IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002. 13(4-5): p. 357-68.
70. Ivashkiv, L.B. and I. Tassioulas, Can SOCS make arthritis better? *J Clin Invest*, 2003. 111(6): p. 795-7.
71. Sengupta, T.K., et al., Activation of monocyte effector genes and STAT family transcription factors by inflammatory synovial fluid is independent of interferon gamma. *J Exp Med*, 1995. 181(3): p. 1015-25.
- 35 72. Shouda, T., et al., Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest*, 2001. 108(12): p. 1781-8.
73. Harada, T., et al., Increased expression of STAT3 in SLE T cells contributes to enhanced chemokine-mediated cell migration. *Autoimmunity*, 2007. 40(1): p. 1-8.
74. Simeone-Penney, M.C., et al., Airway epithelial STAT3 is required for allergic inflammation in a murine model of asthma. *J Immunol*, 2007. 178(10): p. 6191-9.
- 40 75. Hagler, M., Smith-Norowitz, T., Chice, S., Wallner, S., Viterbo, D., Mueller, C., Groos, R., Nowakowski, M., Schulze, R., Zenilman, M., Sphorolipids decrease IgE production in U266 cells by downregulation of BSAP (Pax5), TLR-2, STAT3 and IL-6. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007. 119(S1): p. S263-S263.
76. Benkhart, E.M., et al., Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol*, 2000. 165(3): p. 1612-7.
- 45 77. Sano, S., et al., Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med*, 2005. 11(1): p. 43-9.

78. Lim, C.P., et al., Stat3 contributes to keloid pathogenesis via promoting collagen production, cell proliferation and migration. *Oncogene*, 2006. 25(39): p. 5416-25.
79. Arany, I., et al., Correlation between pretreatment levels of interferon response genes and clinical responses to an immune response modifier (Imiquimod) in genital warts. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. 44(7): p. 1869-73.
- 5 80. Tefferi, A., Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2006: p. 240-5.
81. Roder, S., et al., STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp Hematol*, 2001. 29(6): p. 694-702.
- 10 82. Kim, O.S., et al., JAK-STAT signaling mediates gangliosides-induced inflammatory responses in brain microglial cells. *J Biol Chem*, 2002. 277(43): p. 40594-601.
83. Wyss-Coray, T., Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med*, 2006. 12(9): p. 1005-15.
84. Stelmasiak, Z., et al., Interleukina-6 concentration in serum and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients. *Med Sci Monit*, 2000. 6(6): p. 1104-8.
- 15 85. Ponti, D., et al., Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 2005. 65(13): p. 5506-11.
86. Szotek, P.P., et al., Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(30): p. 11154-9.
87. Al-Hajj, M., et al., Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 2004. 14(1): p. 43-7.
- 20 88. Bleau, A.M., et al., New strategy for the analysis of phenotypic marker antigens in brain tumor-derived neurospheres in mice and humans. *Neurosurg Focus*, 2008. 24(3-4): p. E28.

Los siguientes párrafos numerados definen realizaciones particulares de la presente divulgación:

1. Un método para inhibir una célula madre cancerosa, comprendiendo el método inhibir al menos cierta actividad de la ruta Stat3 en la célula madre cancerosa a través de un inhibidor de la ruta Stat3.
- 25 2. El método del párrafo 1, en donde el método inhibe la renovación de las células madre de cáncer.
3. El método del párrafo 1, en donde el método mata las células madre de cáncer.
4. El método del párrafo 1, en donde el método se lleva a cabo *in vitro*.
5. El método del párrafo 1, en donde el método se lleva a cabo *in vivo* para tratar un cáncer en un sujeto.
- 30 6. El método del párrafo 5, en donde se sabe que el cáncer tiene células madre de cáncer y tiene actividades aberrantes de la ruta STAT3.
7. El método del párrafo 6 en donde se sabe que las células madre de cáncer tienen actividades aberrantes de la ruta Stat3.
8. El método del párrafo 5, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, melanoma, sarcoma, cáncer de hígado, tumores cerebrales, mieloma múltiple y leucemia.
- 35 9. El método del párrafo 8, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer gástrico y cáncer de próstata.
10. El método del párrafo 5, en donde el cáncer es metastásico.
- 40 11. El método del párrafo 5, en donde el cáncer es refractario a una quimioterapia o radioterapia.
12. El método del párrafo 5, en donde el cáncer es inherentemente resistente a la quimioterapia.
13. El método del párrafo 5, en donde el cáncer ha causado recaída en el sujeto después de un tratamiento inicial.
14. El método del párrafo 1, en donde el inhibidor de la ruta Stat3 es aislado, purificado o sintético.

15. El método del párrafo 1, en donde el inhibidor de la ruta Stat3 se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la molécula Stat3 pequeña, un agente de ARNi contra Stat3, un agente antisentido contra Stat3, un inhibidor peptidomimético de Stat3 y un inhibidor de los oligodesoxinucleótidos Stat3 del cuarteto G.
- 5 16. El método del párrafo 1, en donde el mecanismo de inhibición de la inhibición de la ruta STAT3 se selecciona del grupo que consiste en inhibir sustancialmente la fosforilación de la proteína Stat3, inhibiendo sustancialmente la dimerización de la proteína Stat3, inhibiendo sustancialmente la translocación nuclear de la proteína Stat3, inhibiendo sustancialmente la actividad de unión al ADN de la proteína Stat3, y que inhibe sustancialmente las actividades de transcripción de la proteína Stat3.
- 10 17. El método del párrafo 1, en donde el inhibidor de la ruta Stat3 es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato de los mismos.
- 15 18. Un método para inhibir la actividad de la ruta celular de Stat3 en una célula, que comprende administrar a la célula una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato de los mismos, de modo que al menos la actividad de la ruta Stat3 no deseada en la
- 20 19. El método del párrafo 18, en donde la célula es una célula madre de cáncer.
20. El método del párrafo 18, en donde la célula es una célula cancerosa.
21. El método del párrafo 18, en donde se induce la muerte celular en la célula.
22. El método del párrafo 18, en donde el método se lleva a cabo *in vitro*.
- 25 23. El método del párrafo 18, en donde el método se lleva a cabo *in vivo*.
24. Un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con una actividad aberrante de la ruta Stat3 en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietilo)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato de los mismos farmacéuticamente aceptable, tal que la actividad de la
- 30 25. El método del párrafo 24, en donde la actividad aberrante de la ruta Stat3 se puede identificar mediante la expresión de Stat3 fosforilada o un sustituto corriente arriba o corriente abajo de la fosforilación de Stat3.
- 35 26. El método del párrafo 24, en donde el trastorno es un cáncer.
27. El método del párrafo 26, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, melanoma, carcinomas hepatocelulares, cáncer cervical, sarcomas, tumores cerebrales,
- 40 cánceres gástricos, mieloma múltiple, leucemia y linfomas.
28. El método del párrafo 24, en donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, enfermedades inflamatorias del intestino, artritis, trastorno de desmielinización autoinmune, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, lesión por reperusión isquémica y esclerosis múltiple.
- 45 29. Un método para tratar a un paciente, comprendiendo el método las etapas de:
- identificar a un paciente por la actividad aberrante de la ruta STAT3; y
- administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furano-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furano éster 2-il) vinil dimetil éster del ácido fosfórico y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 50

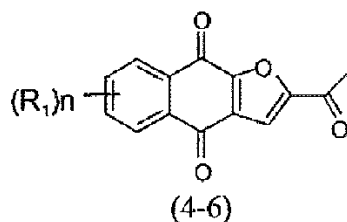
30. El método del párrafo 29, en donde la etapa de identificar al paciente mediante una actividad aberrante de la ruta Stat3 comprende probar la expresión de Stat3 fosforilada o de un sustituto corriente arriba o corriente abajo de la fosforilación de Stat3.
- 5 31. El método del párrafo 29, en donde la etapa de identificar al paciente mediante una actividad aberrante de la ruta Stat3 comprende analizar tejido enfermo o fluido extraído del paciente.
32. El método del párrafo 31, en donde el tejido o fluido enfermo es parte de un tumor.
33. Un método para tratar a un paciente, comprendiendo el método las etapas de:
 identificar a un paciente diagnosticado con un trastorno asociado con una actividad aberrante de la ruta STAT3; y
 administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto seleccionado del grupo que consiste
 10 en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furano-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furano-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 15 34. El método del párrafo 33, en donde la etapa de identificar al paciente comprende probar al menos un biomarcador que indique el trastorno en el paciente.
35. Un kit que comprende:
 al menos un agente para diagnosticar un trastorno asociado con una actividad aberrante de la ruta Stat3; y
 una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-
 20 nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furano-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 25 36. El kit del párrafo 35, en donde al menos un agente analiza al menos un biomarcador que indica la presencia del trastorno.
37. Un kit que comprende:
 al menos un agente para diagnosticar la actividad aberrante de la ruta Stat3; y
 una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-
 30 nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furano-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.
38. El kit del párrafo 37, en donde al menos un agente prueba la expresión de Stat3 fosforilado o de un regulador sustituto corriente arriba o corriente abajo de la fosforilación de Stat3.
- 35 39. Un método para inhibir una célula madre cancerosa, comprendiendo el método administrar a una célula madre cancerosa una cantidad efectiva de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b] furano-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato de los mismos.
- 40 40. El método del párrafo 39, en donde el método se lleva a cabo *in vitro*.
41. El método del párrafo 39, en donde el método se lleva a cabo *in vivo* para tratar un cáncer en un sujeto.
42. El método del párrafo 41, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer gástrico, melanoma, mieloma múltiple, tumores cerebrales, sarcomas, meduloblastoma y
 45 leucemia.
43. El método del párrafo 41, en donde el cáncer es metastásico.
44. El método del párrafo 41, en donde el cáncer es refractario a una quimioterapia o radioterapia.
45. El método del párrafo 41, en donde el cáncer es inherentemente resistente a la quimioterapia.

46. El método del párrafo 41, en donde el cáncer ha causado recaída en el sujeto después de un tratamiento inicial.
47. Un método para identificar un fármaco candidato capaz de inhibir una célula madre de cáncer, comprendiendo el método la detección de un fármaco candidato que inhibe la actividad de la ruta Stat3.
- 5 48. El método del párrafo 47, en donde el fármaco candidato es capaz de inducir la muerte celular en las células madre de cáncer.
49. El método del párrafo 47, en donde el fármaco candidato es capaz de inhibir la autorrenovación de las células madre de cáncer.
- 10 50. El método del párrafo 47, en donde el fármaco candidato se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña Stat3 inhibidor, un agente de IARN contra Stat3, un agente antisentido contra Stat3, un peptidomimético inhibidor de Stat3 y un cuarteto G inhibidor de oligodesoxinucleótidos de Stat3.
51. El método del párrafo 47, en donde el fármaco candidato inhibe sustancialmente la fosforilación de la proteína Stat3.
52. El método del párrafo 47, en donde el fármaco candidato inhibe sustancialmente la dimerización de la proteína Stat3.
- 15 53. El método del párrafo 47, en donde el fármaco candidato inhibe sustancialmente la translocación nuclear de la proteína Stat3.
54. El método del párrafo 47, en donde el fármaco candidato inhibe sustancialmente las actividades de unión al ADN de la proteína Stat3.
- 20 55. El método del párrafo 47, en donde el fármaco candidato inhibe sustancialmente las actividades de transcripción de la proteína Stat3.
56. Un método para tratar a un sujeto para cáncer refractario a un tratamiento estándar, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b] furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato de los mismos farmacéuticamente aceptable.
- 25 57. El método del párrafo 56, en donde el tratamiento estándar comprende un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en una quimioterapia, una radioterapia y cirugía.
- 30 58. El método del párrafo 56, en donde el cáncer es inherentemente resistente a la quimioterapia.
59. Un método para tratar o prevenir la recaída del cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable.
- 35 60. El método del párrafo 59, en donde la composición farmacéutica se administra como una terapia adyuvante después de la cirugía.
- 40 61. Un método para tratar o prevenir la metástasis del cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il) vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 45 62. El método del párrafo 61, en donde la composición farmacéutica se administra como una terapia adyuvante después de la cirugía.
- 50 63. Un método para atacar selectivamente células cancerosas en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]fura-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-

- 5 tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato de los mismos farmacéuticamente aceptable, de modo que la concentración del compuesto en el plasma del sujeto no se mantenga por encima de una concentración durante más de 24 horas después de cada dosis, matando de forma selectiva las células cancerosas y preservando sustancialmente las células normales.
64. El método del párrafo 63, en donde la composición farmacéutica se administra de manera tal que la concentración del compuesto en el plasma del sujeto no se mantiene por encima de una concentración crítica por más de una duración seleccionada del grupo que consiste en 12, 16 y 20 horas después de cada dosis.
65. El método del párrafo 63, en donde la concentración crítica es de aproximadamente 100 μM .
- 10 66. El método del párrafo 63, en donde la concentración crítica es de aproximadamente 50 μM .
67. El método del párrafo 63, en donde la concentración crítica es de aproximadamente 30 μM .
68. El método del párrafo 63, en donde la concentración crítica es de aproximadamente 20 μM .
- 15 69. El método del párrafo 63, en donde las células cancerosas forman parte de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer renal, sarcoma, mieloma múltiple, cáncer de mama metastásico, leucemia, linfoma, cáncer de esófago, tumor cerebral, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de conductos biliares, cáncer de hueso, cáncer de ojo (retinoblastoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer de pituitaria, cáncer de recto, cáncer de glándula salival y cáncer de faringe.
- 20 70. El método del párrafo 63, en donde las células cancerosas forman parte de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer gástrico y cáncer de próstata.
- 25 71. El método del párrafo 63, en donde las células cancerosas forman parte de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer renal, sarcoma, mieloma múltiple, cáncer de mama metastásico, leucemia, linfoma, cáncer de esófago, tumor cerebral, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de la vía biliar, cáncer de hueso, cáncer de ojo (retinoblastoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer de pituitaria, cáncer de recto, cáncer de glándula salival, cáncer de faringe nasal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, neuroblastoma, cáncer de cuello uterino, leucemia, melanoma, epitermoide oral, queratinocitos y cáncer de piel.
- 30 72. Un método para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato de los mismos farmacéuticamente aceptable.
- 35 73. El método del párrafo 72, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer renal, sarcoma, mieloma múltiple, cáncer de mama metastásico, leucemia, linfoma, cáncer de esófago, tumor cerebral, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de vías biliares, cáncer de hueso, cáncer de ojo (retinoblastoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer de pituitaria, cáncer de recto, cáncer de glándula salival y faringe.
- 40 74. El método del párrafo 72, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer cervical, carcinoma colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer gástrico y cáncer de próstata.
- 45 75. El método del párrafo 72, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer gástrico y cáncer de mama metastásico.
76. El método del párrafo 72, en donde el cáncer es metastásico.
77. El método del párrafo 72, en donde el sujeto es un mamífero.
- 50 78. El método de uno cualquiera de los párrafos 56 a 77, en donde la composición farmacéutica se administra en una dosis de aproximadamente 1 mg/m^2 a aproximadamente 5000 mg/m^2 (I.V.) o de aproximadamente 1 mg/m^2 a aproximadamente 50000 mg/m^2 (PO).
79. El método de uno cualquiera de los párrafos 56 a 77, en donde la composición farmacéutica se administra en una dosis de aproximadamente 2 mg/m^2 a aproximadamente 3000 mg/m^2 (I.V.) o de aproximadamente 10 mg/m^2 a aproximadamente 50000 mg/m^2 (PO).

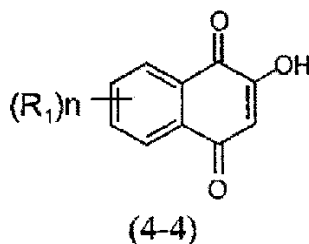
80. El método de uno cualquiera de los párrafos 56 a 77, en donde la composición farmacéutica se administra por vía oral y no más de cuatro veces al día (QID).
81. El método de uno cualquiera de los párrafos 56 a 62, y 72 a 77, en donde la composición farmacéutica se administra de tal manera que la concentración del compuesto en el plasma del sujeto no se mantiene por encima de una concentración crítica durante más de 24 horas después de cada dosis.
82. El método del párrafo 81, en donde la composición farmacéutica se administra de manera tal que la concentración del compuesto en el plasma del sujeto no se mantiene por encima de una concentración crítica por más de una duración seleccionada del grupo que consiste en 12, 16 y 20 horas después de cada dosis.
83. El método del párrafo 81, en donde la concentración crítica es de aproximadamente 100 µM.
84. El método del párrafo 81, en donde la concentración crítica es de aproximadamente 50 µM.
85. El método del párrafo 81, en donde la concentración crítica es de aproximadamente 30 µM.
86. El método del párrafo 81, en donde la concentración crítica es de aproximadamente 20 µM.
87. El método de uno cualquiera de los párrafos 56 a 77, en donde la composición se aísla, purifica o sintetiza.
88. Una composición farmacéutica que comprende:
- un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos; y
- un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
89. La composición farmacéutica del párrafo 88, en donde la composición es adecuada para administración oral, nasal, tópica, rectal, vaginal o parenteral, o inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular.
90. La composición farmacéutica del párrafo 88, en donde el excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable comprende un lípido para administración intravenosa.
91. La composición farmacéutica del párrafo 90, en donde el lípido se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos, fosfatidilcolinas sintéticas, fosfatidilcolinas naturales, esfingomielina, ceramidas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilgliceroles, ácidos fosfatídicos, sulfato de colesterol y hapteno y lípidos conjugados con PEG.
92. La composición farmacéutica del párrafo 90, en donde el lípido está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una nanoemulsión, micelas, emulsiones, suspensión, nanosuspensión, noisoma o liposomas.
93. La composición farmacéutica del párrafo 88, en donde el excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable está en una forma seleccionada del grupo que consiste en emulsión micelar, suspensión y suspensión de nanopartículas, y además comprende una proteína aceptable por vía intravenosa para administración intravenosa.
94. La composición farmacéutica del párrafo 93, en donde la proteína aceptable por vía intravenosa es albúmina humana o un derivado de la misma.
95. La composición farmacéutica del párrafo 88, en donde el excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable comprende un material ceroso para administración oral.
96. La composición farmacéutica del párrafo 95, en donde el material céreo se selecciona del grupo que consiste en mono-, di- o tri-glicéridos, ésteres de mono-, di-ácidos grasos de PEG, vitamina E conjugada con PEG (vitamina E TPGs) y Gelucire.
97. La composición farmacéutica del párrafo 96, en donde Gelucire se selecciona del grupo que consiste en Gelucire 44/14, Gelucire 43/01, Gelucire 50/02, Gelucire 50/13, Gelucire 37/02, Gelucire 33/01, Gelucire 46/07, y Gelucire 35/10.
98. La composición farmacéutica del párrafo 88, en donde el excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en capriol, transcitol hp, labrafil M, labrasol, triacetina, pharماسolv, etanol, polivinil pirrolidina, carboximetil celulosa, Tween 20, y Tween 80.
99. La composición farmacéutica del párrafo 88, en donde el excipiente farmacéuticamente aceptable se mezcla con un tensioactivo.
100. La composición farmacéutica del párrafo 99, en donde el tensioactivo es Tween 80 o Tween 20.101. La composición farmacéutica de los párrafos 99 a 100, en donde la composición está formulada para administración oral.

102. Un proceso de preparación de un compuesto de fórmula 4-6,



en donde R1 es H, Cl o F,

que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula 4-4,



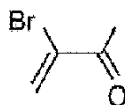
5

con una cetona en un solvente en presencia de una base y un agente oxidante.

103. El proceso del párrafo 102, en donde el agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en O₂, Br₂ y CBrCl₃.

104. El proceso del párrafo 102, en donde la reacción se lleva a cabo en un recipiente al aire libre.

105. El proceso del párrafo 102, en donde la cetona es un compuesto de fórmula 4-3.

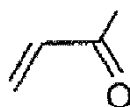


(4-3)

10

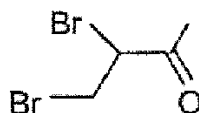
106. El proceso del párrafo 105, que comprende además las etapas de:

hacer reaccionar un compuesto de fórmula 4-1,



(4-1)

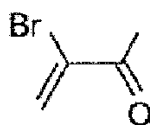
con bromuro con o sin solvente para producir un compuesto de fórmula 4-2,



(4-2)

15

y posteriormente hacer reaccionar el compuesto de fórmula 4-2 en un disolvente en presencia de una base para producir el compuesto de fórmula 4-3.



(4-3)

107. El proceso del párrafo 106 en donde todas las etapas tienen lugar en el mismo contenedor.
108. El proceso del párrafo 102, en donde el disolvente se selecciona del grupo que consiste en tetrahidrofurano (THF), dioxano y tolueno, y la base se selecciona del grupo que consiste en 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), trietilamina y diisopropiletil amina.
109. Un compuesto de la fórmula mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il) vinil] éster del ácido fosfórico.
110. Un compuesto de la fórmula 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico.
111. Un proceso de preparación del compuesto mono-[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, comprendiendo el proceso hacer reaccionar el compuesto 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona con una solución seleccionada del grupo que consiste en bis(trimetilsilil)amida de litio, bis(trimetilsilil)amida de sodio y bis(potasio)trimetilsilil)amida, seguido de la adición de una solución de clorofosfato de dimetilo.
112. El proceso del párrafo 111, que comprende además purificar un producto crudo obtenido de la reacción disolviendo el producto en CH₂Cl₂, lavándolo con NH₄CL saturado y agua, secándolo sobre MgSO₂ y posteriormente pasando el producto a través de cromatografía en columna.
113. Un proceso de preparación del compuesto 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil dimetil éster del ácido fosfórico, comprendiendo el proceso hacer reaccionar el compuesto mono-[1-(4,9)-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico con bromuro de trimetilsililo.
114. El proceso del párrafo 113, que comprende además purificar un producto crudo obtenido de la reacción mediante una HPLC semipreparativa.

Secuencia de listados

<110> BOSTON BIOMEDICAL, INC

UN GRUPO NOVEDOSO DE INHIBIDORES DE LA RUTA STAT3 E INHIBIDORES DE LA RUTA DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER

<130> P126934EPPC01

<140> EP16156335.8

<141> 2008-09-10

<150> US60/971,144

<151> 2007-09-10

<150> US61/013,372

<151> 2007-12-13

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_miscláneas
 <222> (1)..(1)
 <223> 5'-Biotina
 <400> 1
 5 gatcctctg ggaattccta gatc 24
 <210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 <213>Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 2
 ggatctagaa tcagctacag cagc 24
 <210> 3
 15 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 3
 tcctctagag ggcaatctcc attg 24
 <210>4
 <211>22
 <212>DNA
 25 <213>Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 4
 ccctctagat ggttctgga ac 22
 30 <210>5
 <211>21
 <212>DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> cebador
 <400> 5
 gctctagaaa ccccttttg g 2

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-4,9-dihidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato de los mismos farmacéuticamente aceptable, o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto, para uso en:
- 5 (i) un método para tratar a un sujeto, comprendiendo el método las etapas de identificar a un sujeto por actividad aberrante de la ruta de Stat3 y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto;
- (ii) un método *in vivo* para inhibir una célula madre cancerosa para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar a una célula madre cancerosa una cantidad eficaz del compuesto;
- 10 (iii) un método para tratar a un sujeto para cáncer refractario a una quimioterapia y/o radioterapia, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica;
- (iv) un método para tratar o prevenir la recaída del cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica;
- 15 (v) un método para tratar o prevenir la metástasis del cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica;
- (vi) un método para inhibir una célula madre cancerosa para tratar el cáncer en un sujeto, en donde el método se dirige selectivamente a las células cancerosas en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto una composición farmacéutica, de manera que la concentración del compuesto en el plasma del sujeto no se mantenga por encima de una concentración crítica durante más de 24 horas después de cada dosis, destruyendo de esa forma las células cancerosas de forma selectiva y al mismo tiempo protegiendo las células normales;
- 20 (vii) un método para inhibir una célula madre de cáncer para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica.
2. El compuesto o composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, partes (ii) a (vii) en donde el cáncer:
- 25 (a) se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, melanoma, carcinoma hepatocelular, cáncer de cuello uterino, sarcomas, tumores cerebrales, cánceres gástricos, cáncer gastrointestinal, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, mieloma múltiple, leucemia y linfomas; y / o
- (b) tiene actividad de células madre cancerosas y de la ruta STAT3 aberrante.
- 30 3. El compuesto o composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1(i), en donde la actividad aberrante de la ruta Stat3 se puede identificar mediante la expresión de Stat3 fosforilado o un sustituto corriente arriba o corriente abajo de la fosforilación de Stat3.
4. El compuesto o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, parte (ii) o (vii) en donde:
- (a) el cáncer es metastásico;
- 35 (b) el cáncer es refractario a una quimioterapia o radioterapia;
- (c) el cáncer es inherentemente resistente a la quimioterapia; o
- (d) el cáncer ha causado recaída en el sujeto después de un tratamiento inicial.
5. Un método para inhibir una célula madre cancerosa, comprendiendo el método administrar a una célula madre cancerosa una cantidad efectiva de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b] furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde el método se lleva a cabo *in vitro*.
- 40 6. Un kit que comprende:
- 45 al menos un agente para diagnosticar un trastorno asociado con actividad aberrante de la ruta Stat3 o al menos un agente para diagnosticar actividad aberrante de la ruta Stat3; y
- una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etil-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, mono-[1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-

il)-vinil] éster del ácido fosfórico, 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, y una sal o solvato aceptable de los mismos.

7. Un compuesto de fórmula mono-[1-(4,9-dioxo-4,9-dihidronafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico o 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico.

5 8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 7 y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

9. Un proceso de preparación del 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidronafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico, comprendiendo el proceso hacer reaccionar el compuesto 2-ácetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona con una solución seleccionada del grupo que consiste en bis(trimetilsilil) amida de litio, bis(trimetilsilil)amida de sodio y
10 bis(trimetilsilil)amida de potasio, seguido de la adición de una solución de clorofosfato de dimetilo y, opcionalmente, purificar un producto crudo obtenido de la reacción disolviendo el producto en CH₂Cl₂, lavándolo con NH₄Cl saturado y agua, secándolo sobre MgSO₂, y posteriormente pasando el producto a través de cromatografía en columna.

10. Un proceso de preparación del compuesto mono-[1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-2-il)-vinil] éster del ácido fosfórico, comprendiendo el proceso hacer reaccionar el compuesto 1-(4,9-dioxo-4,9-dihidro-nafto[2,3-b]furan-
15 2-il)-vinil éster dimetil éster del ácido fosfórico con bromuro de trimetilsililo, y opcionalmente purificar un producto crudo obtenido de la reacción por una HPLC semipreparativa.

Figura 1

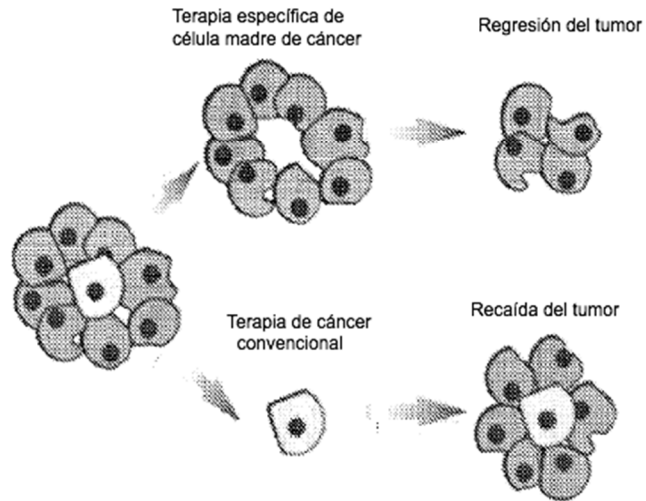


Figura 2

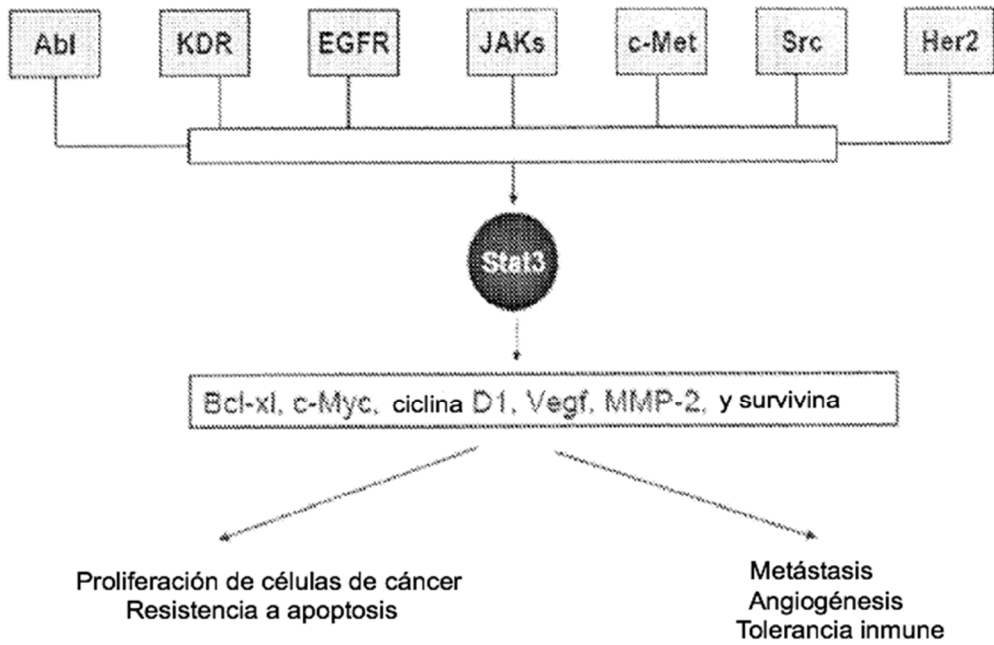


Figura 3A

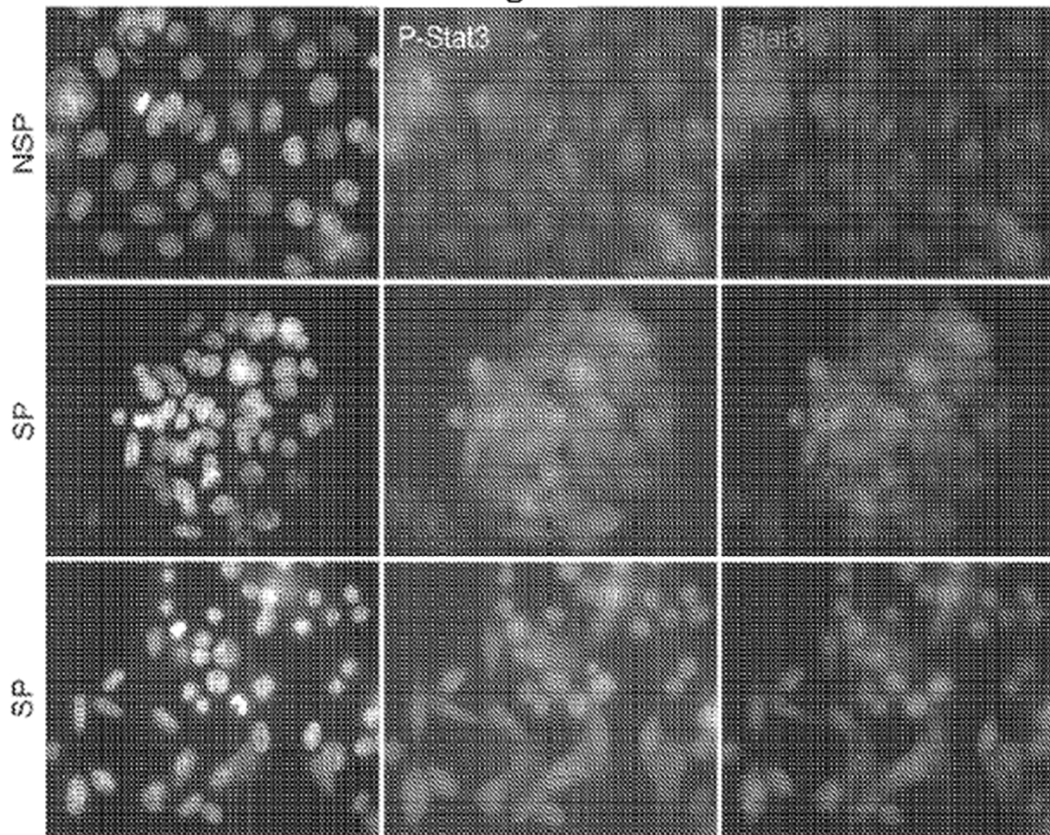


Figura 3B

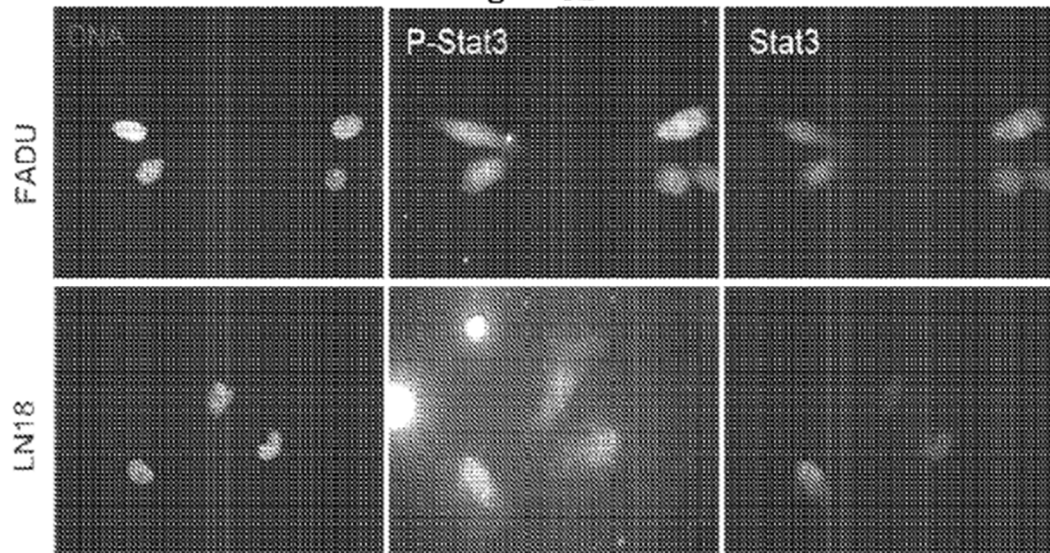


Figura 4A

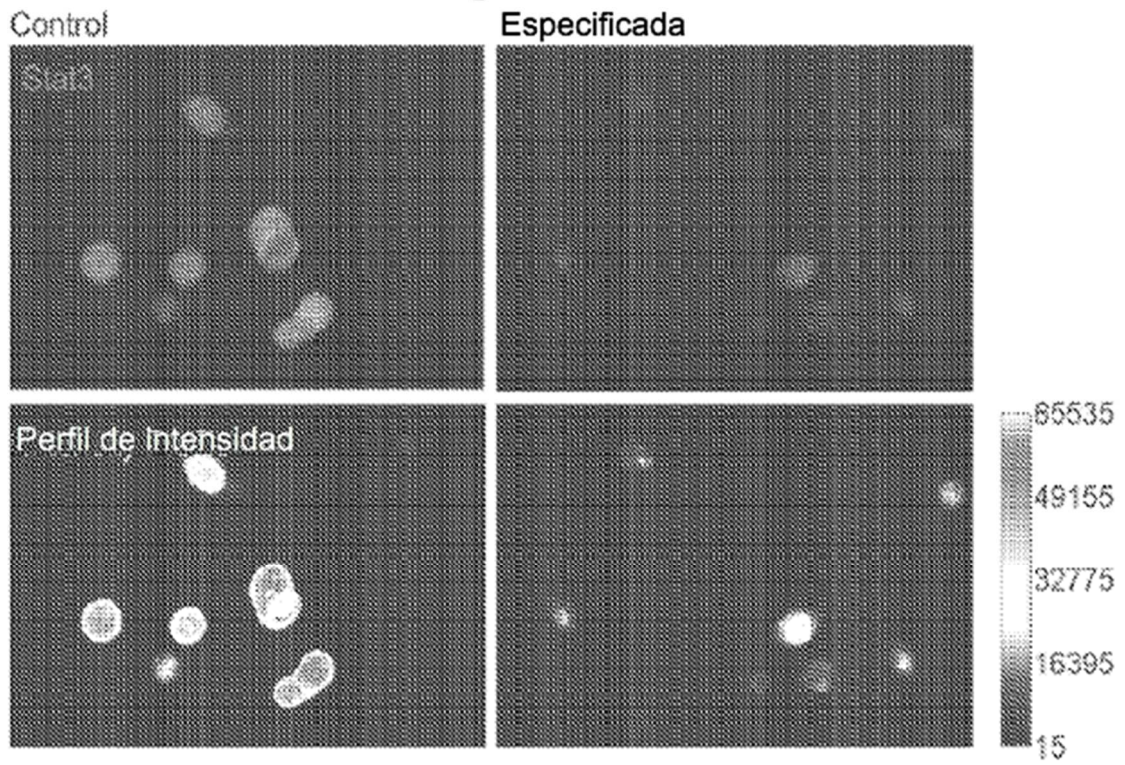


Figura 4B

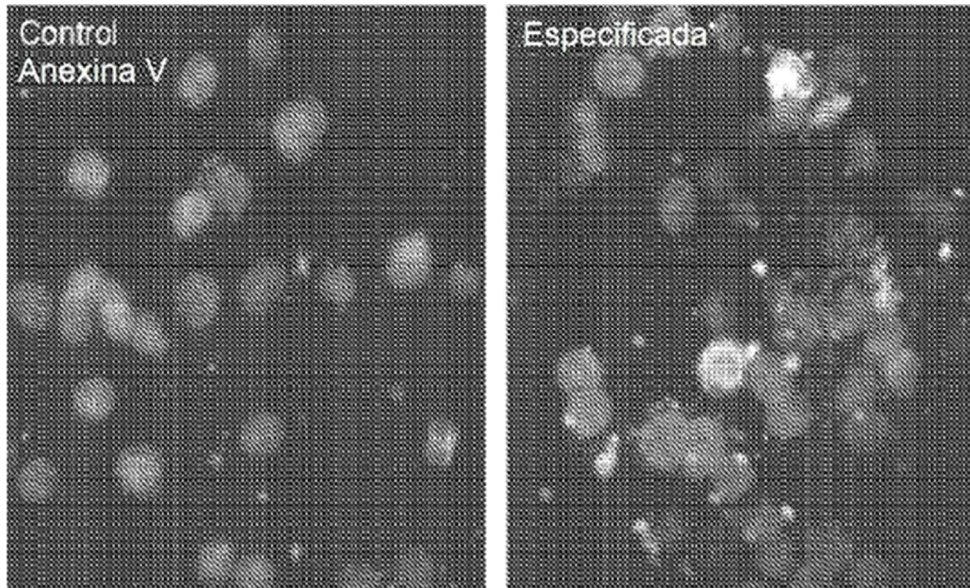


Figura 5

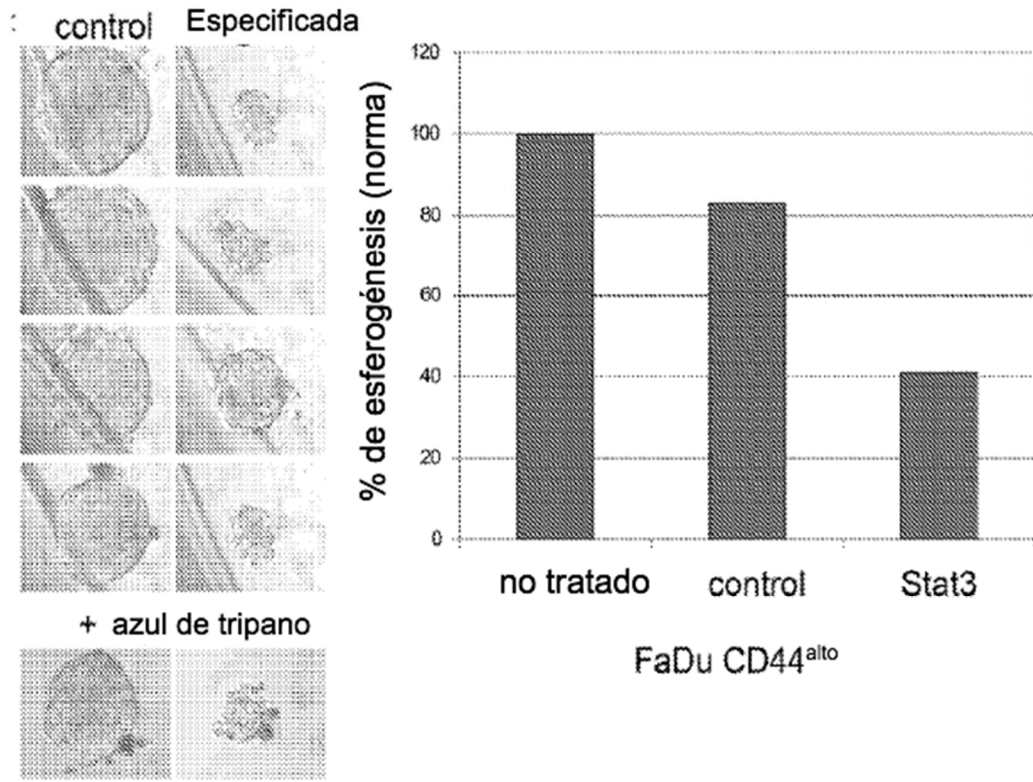


Figura 6

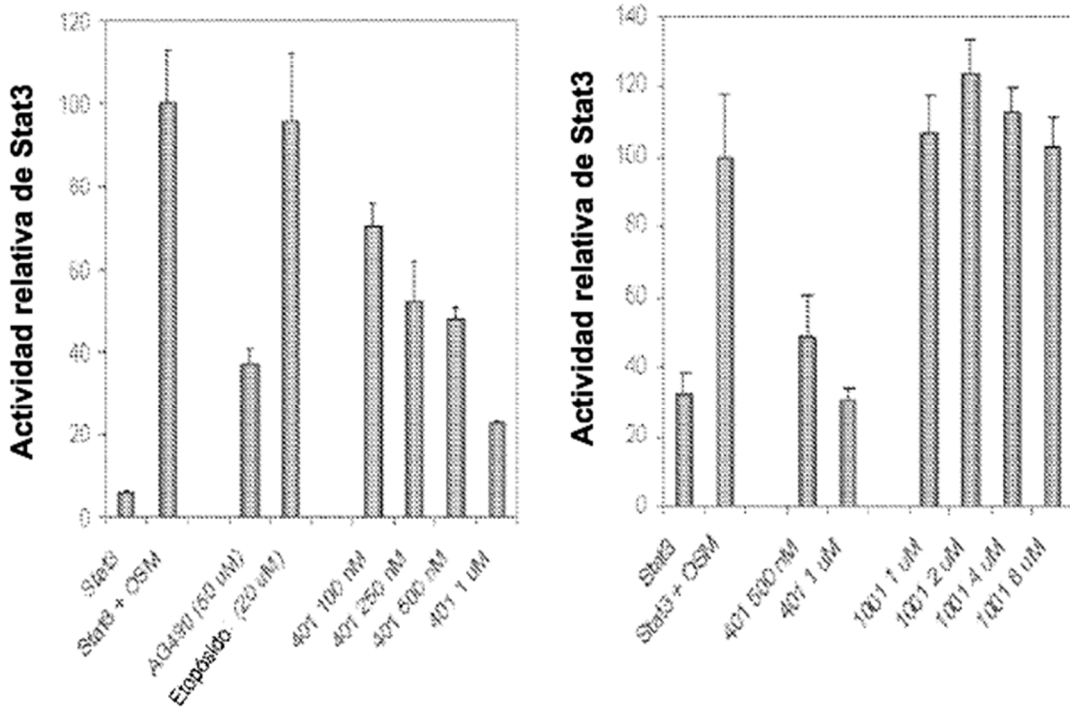


Figura 7A

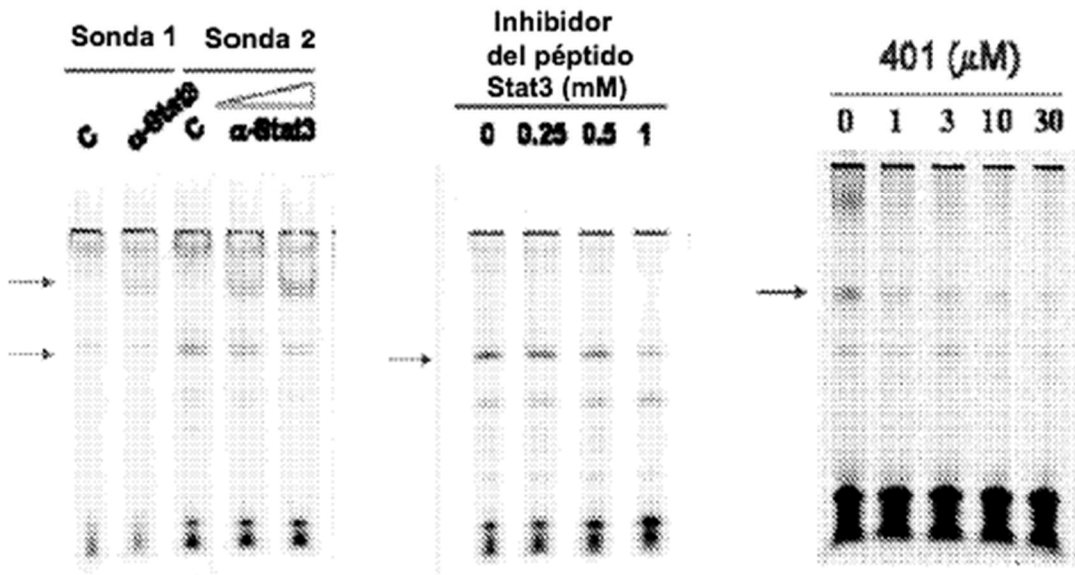


Figura 7B

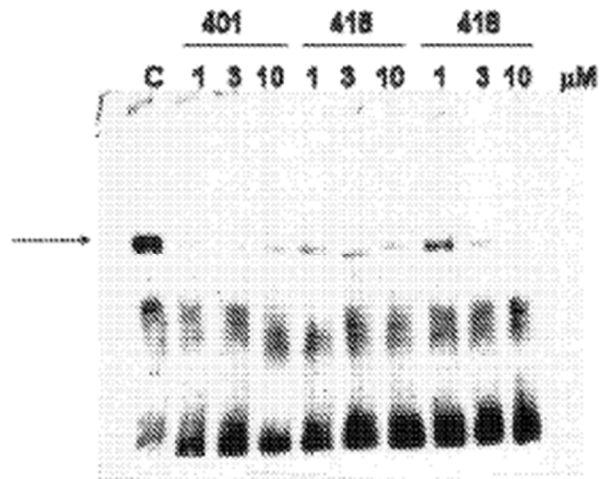
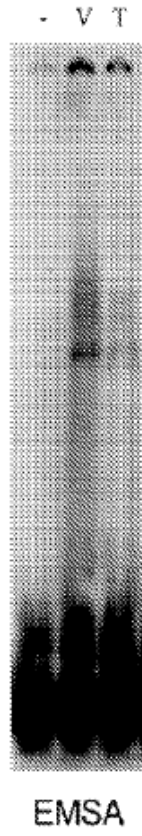


Figura 8

A.



B.

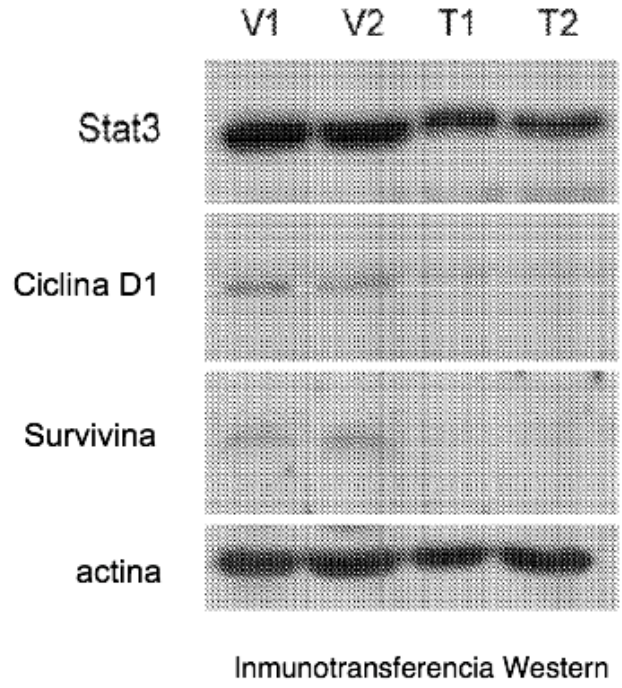
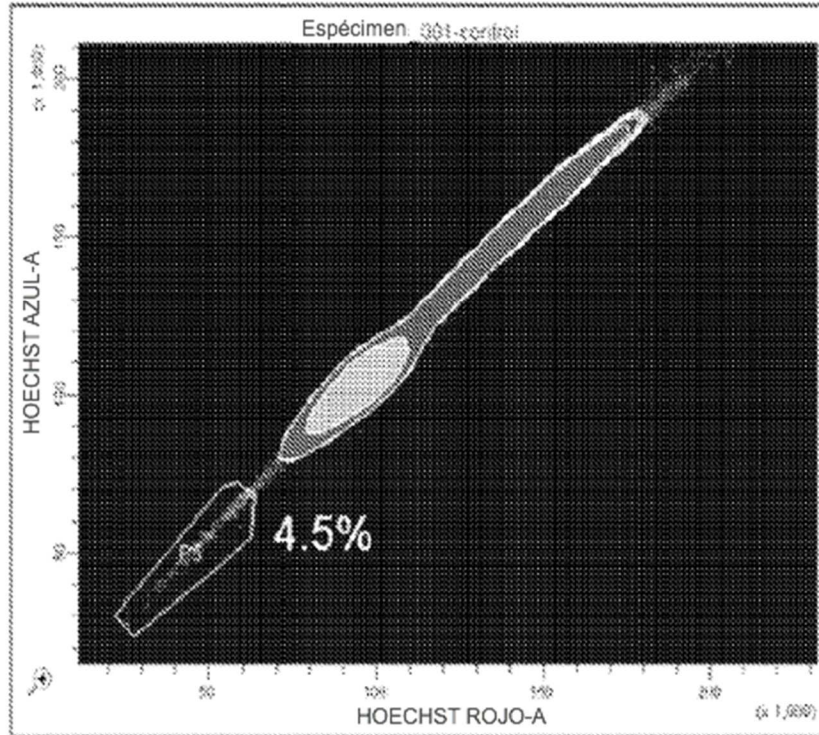
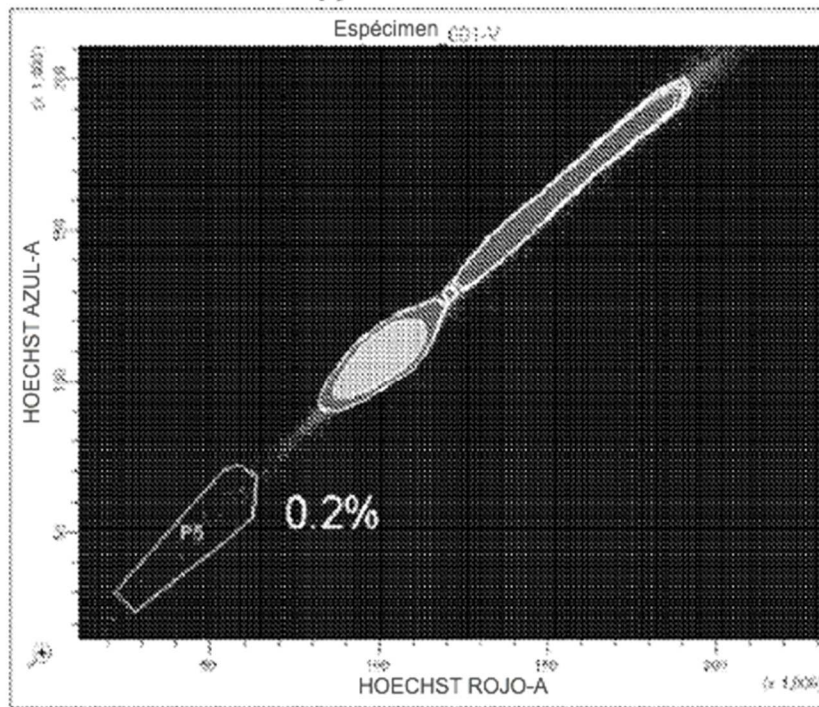


Figura 9A



(-) Verapamilo



(+) Verapamilo

Figura 9B

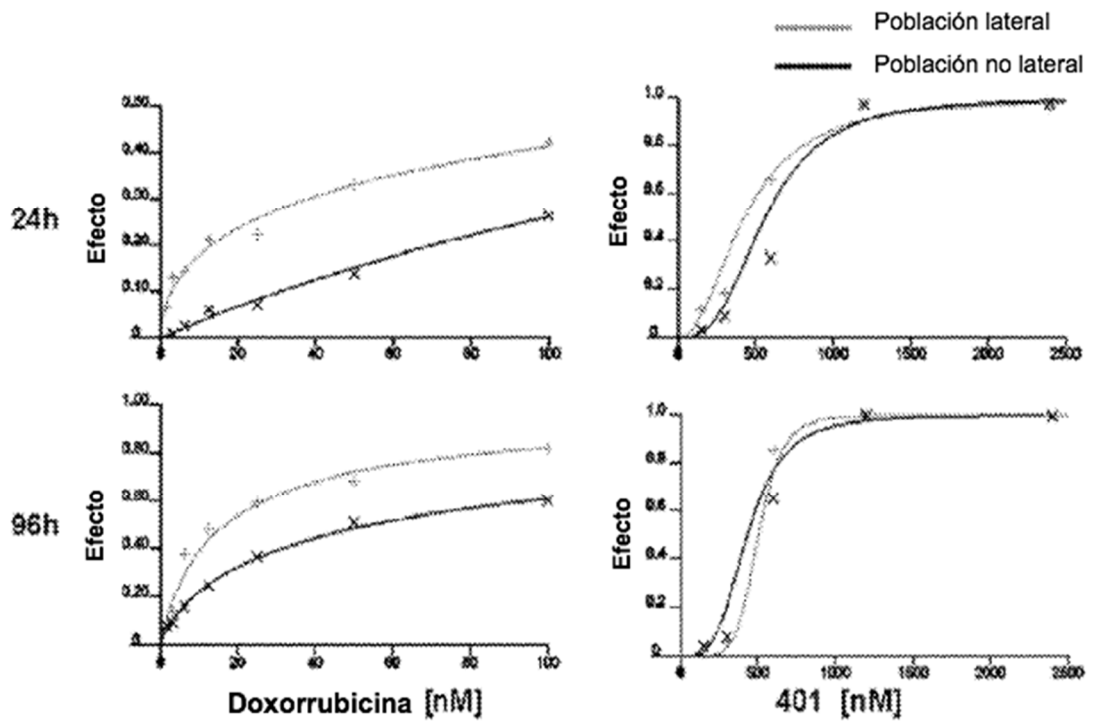


Figura 10A

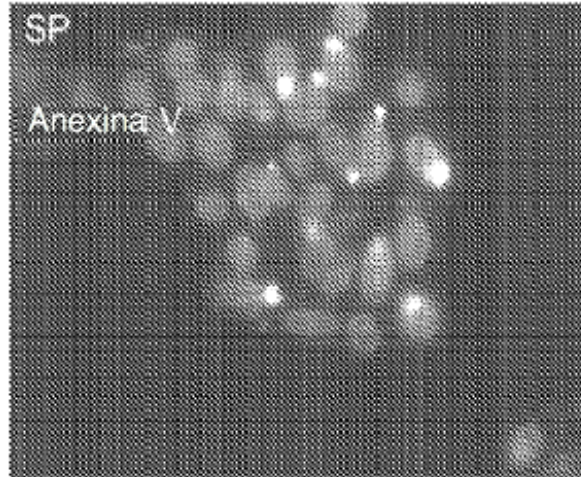


Figura 10B

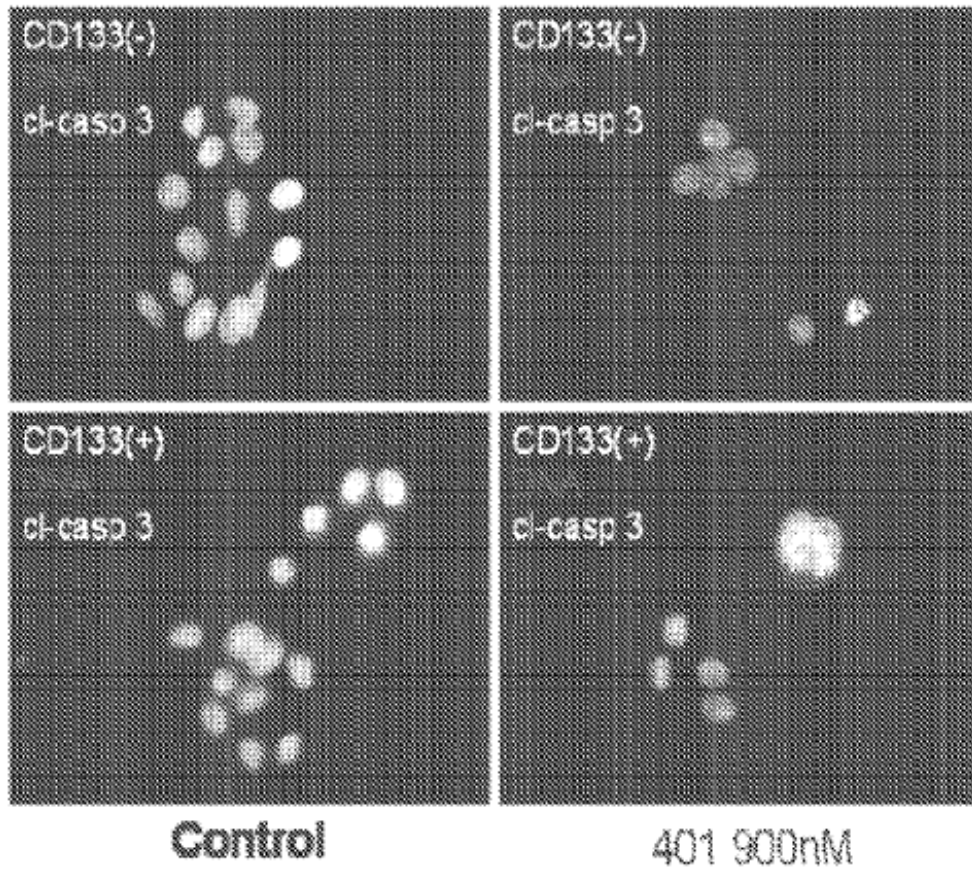


Figura 11

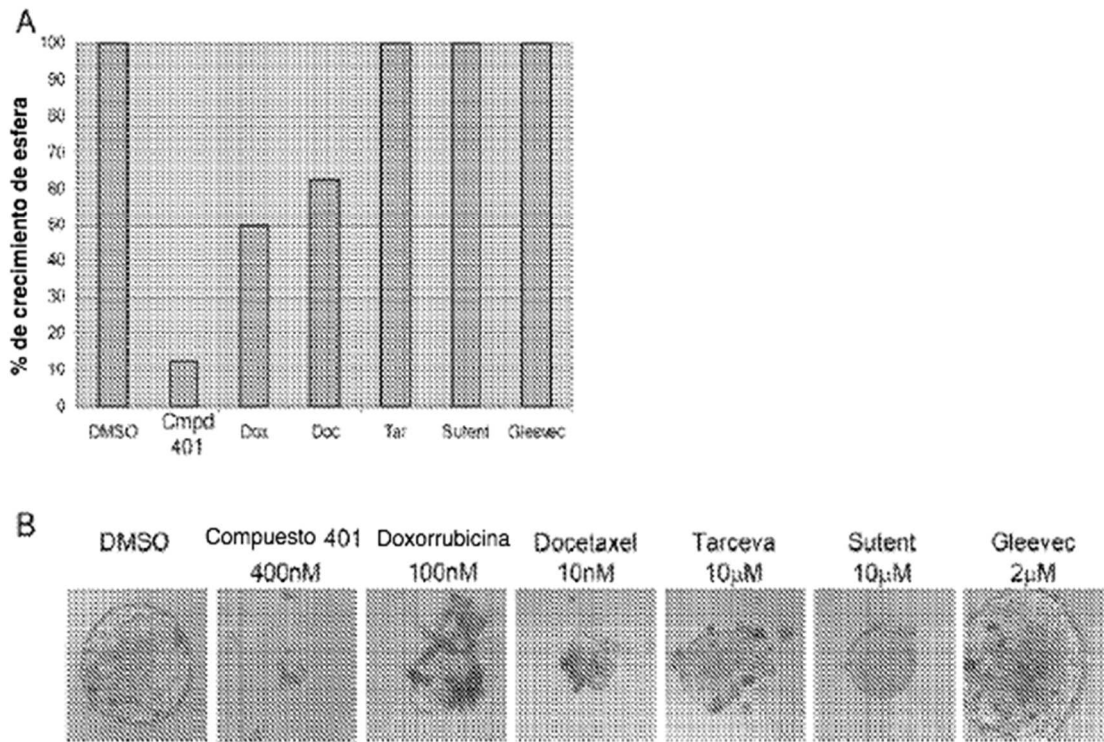


Figura 12

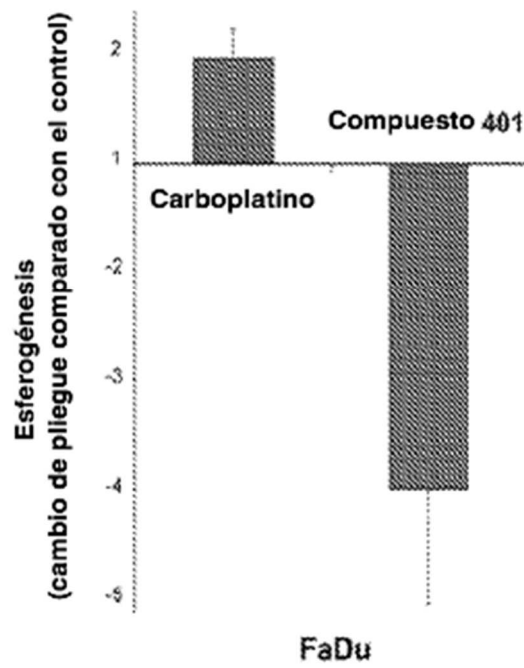
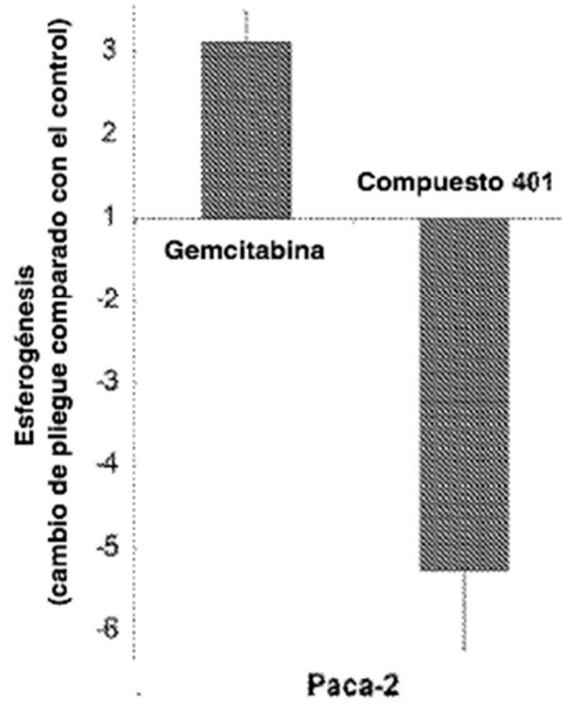


Figura 13

Células DU145 - Tratamiento de 5 horas

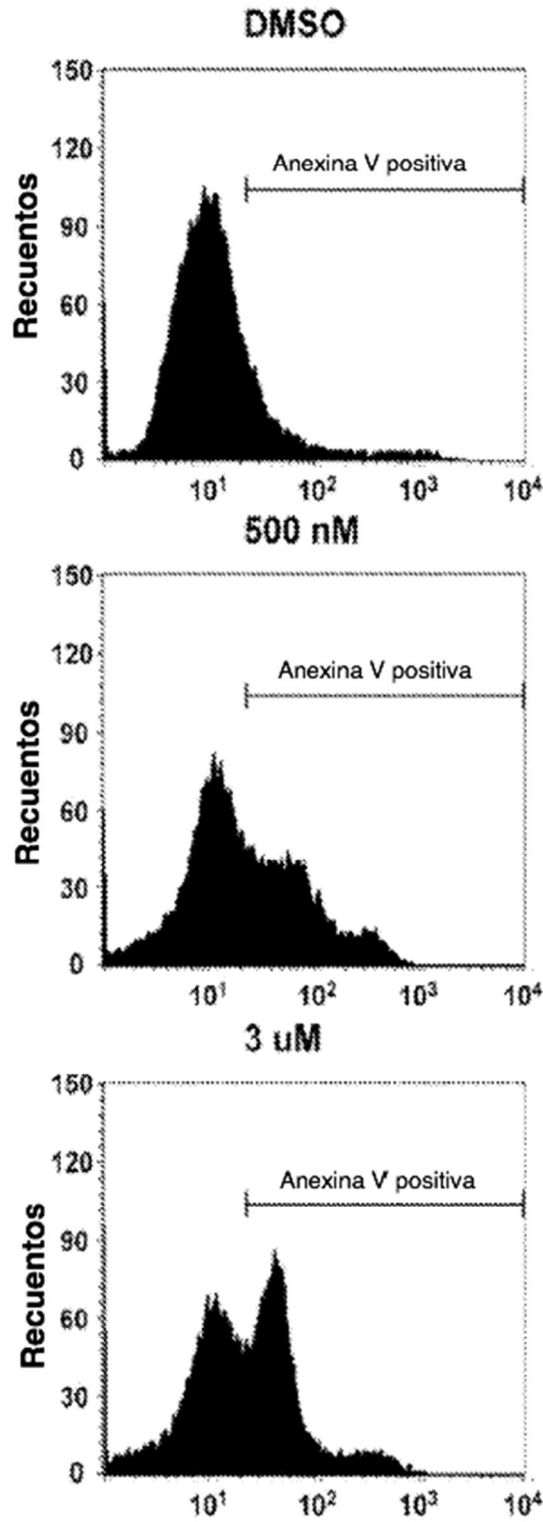


Figura 14

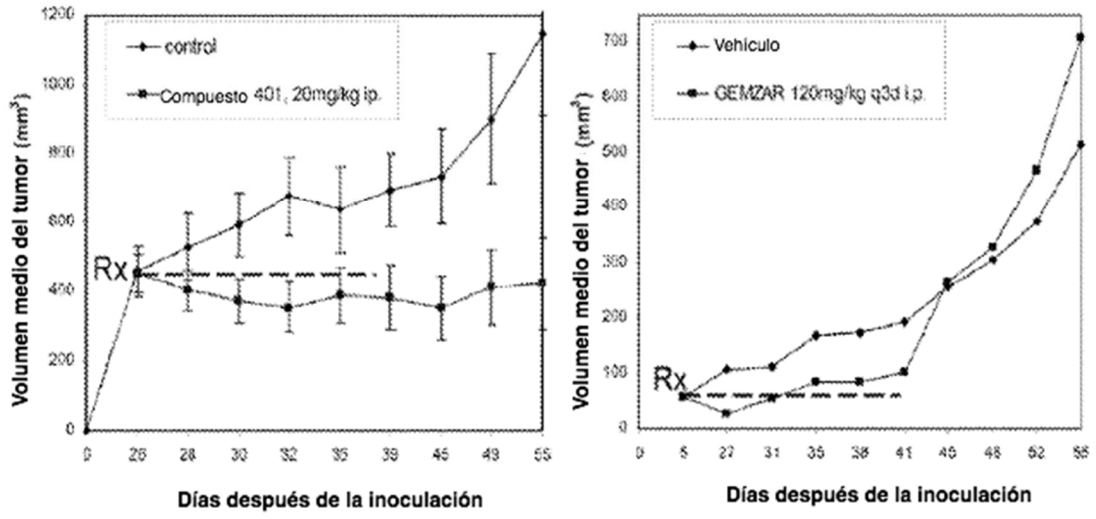


Figura 15

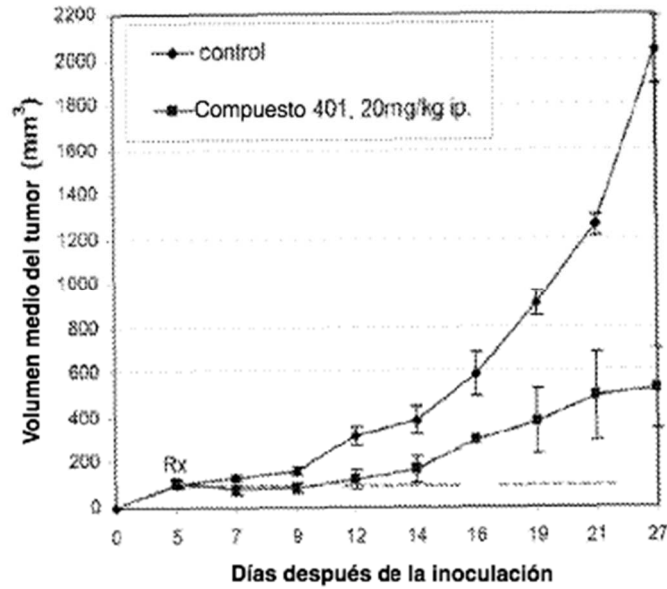


Figura 16

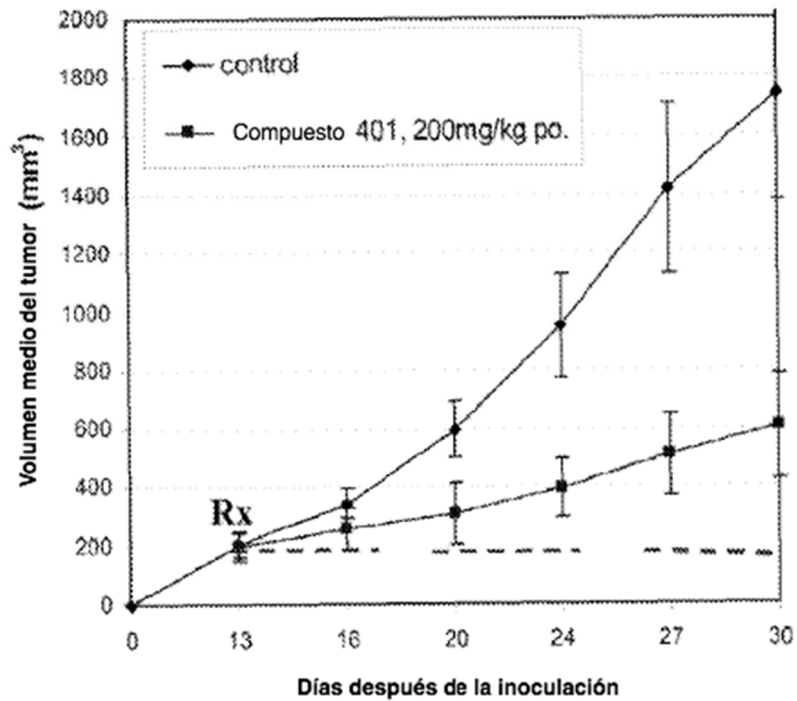


Figura 17

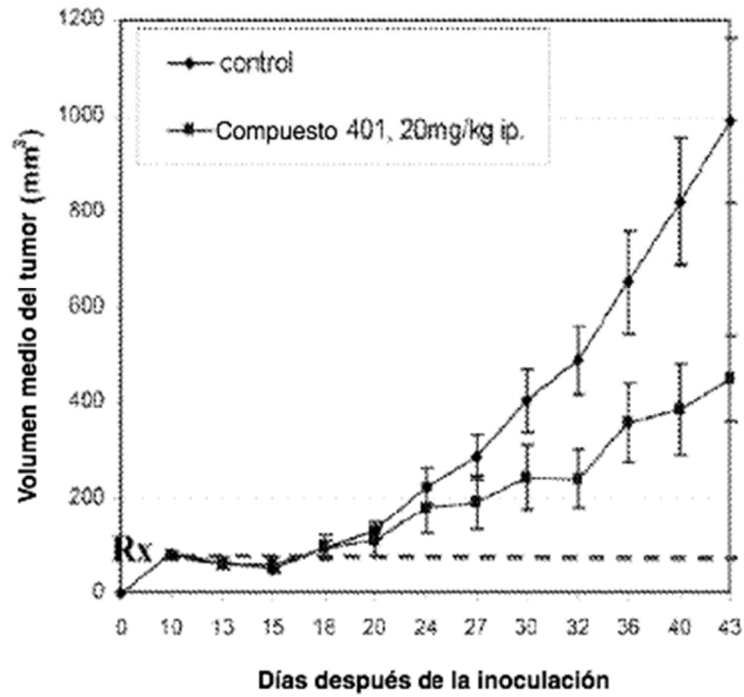


Figura 18

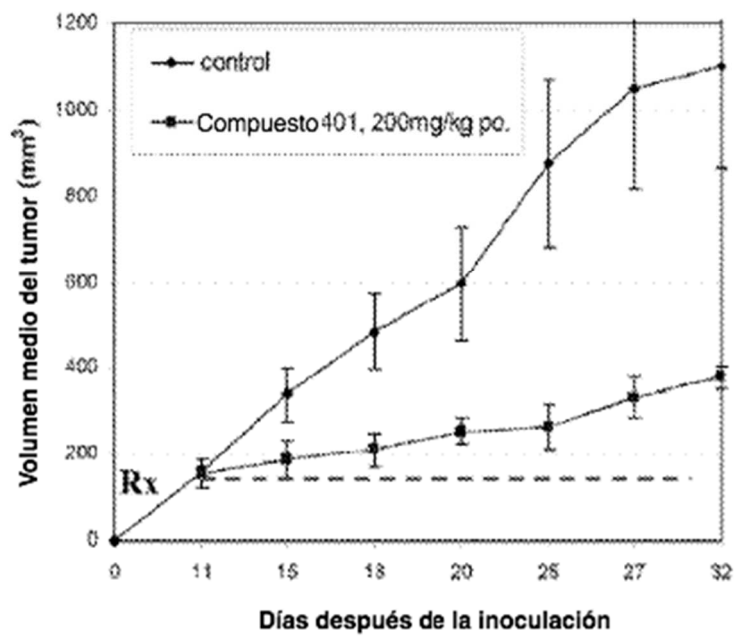


Figura 19

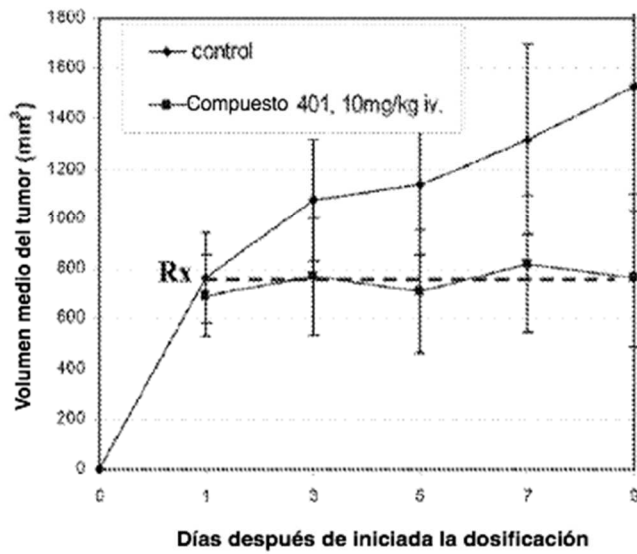


Figura 20

Control @ día 30



401 @ día 30

Representante de fotografías *in situ*;



Figura 21

