

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 882 223**

51 Int. Cl.:

A61K 31/573 (2006.01)
C07J 5/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 5/46 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2015** **E 18198653 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.05.2021** **EP 3456330**

54 Título: **17Alfa-valerato de cortexolona para el uso en el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

08.10.2014 EP 14188063

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

01.12.2021

73 Titular/es:

COSMO TECHNOLOGIES LTD (100.0%)
Riverside II, Sir John Rogerson's Quay
Dublin 2, IE

72 Inventor/es:

GERLONI, MARA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 882 223 T3

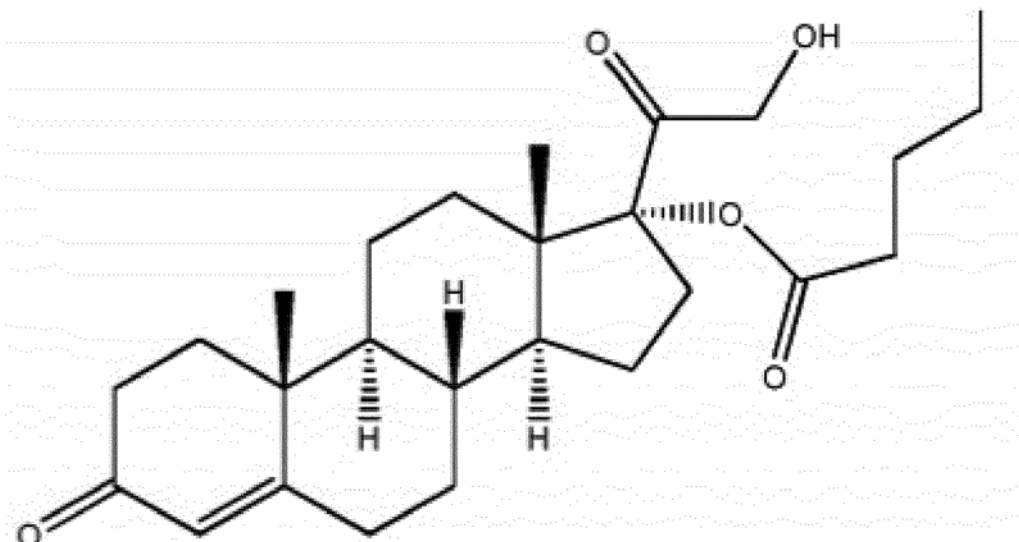
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

17Alfa-valerato de cortexolona para el uso en el tratamiento de tumores

Sumario de la invención

La presente invención proporciona el compuesto 17.alfa.-valerato de cortexolona de la siguiente fórmula, para su uso en el tratamiento de carcinoma de próstata, carcinoma mamario, carcinoma pancreático, carcinoma pulmonar, carcinoma del tracto gastrointestinal, cáncer de riñón, carcinoma tiroideo, carcinoma uterino o carcinoma adrenal; y en donde el carcinoma de próstata es resistente a terapia dirigida con anti andrógenos.



17α-valerato de cortexolona

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto anterior para su uso en el tratamiento de las afecciones anteriormente mencionadas.

Antecedentes de la invención

Un tumor, o neoplasma, se define como una masa de nuevo tejido que persiste y crece independientemente de sus estructuras circundantes, y que no tiene uso fisiológico (Doreland's Medical Dictionary, 23 ED. 1960).

Están disponibles varias clasificaciones para los tumores: para la explotación de esta solicitud de patente, los más importantes son los tumores epiteliales.

Los tumores epiteliales son neoplasmas derivados de células epiteliales, el tipo de células que revisten órganos internos huecos y superficies corporales; este grupo incluye muchos de los cánceres más comunes, e incluye la mayoría de los que se desarrollan en la mama, la próstata, el pulmón, el páncreas y el tracto gastrointestinal.

En algunos casos, los tumores epiteliales también se pueden caracterizar por la presencia de receptores de hormonas específicos en las células tumorales, lo que da al tumor una sensibilidad a hormonas.

Los carcinomas, que son tumores malignos derivados de células epiteliales, constituyen aproximadamente 85 de cada 100 cánceres (85%).

Un ejemplo de carcinoma epitelial es el carcinoma pancreático (también denominado cáncer pancreático).

El cáncer pancreático es una de las formas más mortales de carcinoma. Las células exocrinas y endocrinas del páncreas forman tipos de tumores completamente diferentes. Los tumores pancreáticos exocrinos constituyen el tipo de cáncer pancreático más común (más de 95%). Aunque se pueden desarrollar en el páncreas quistes benignos (no cancerosos) y tumores benignos (adenomas), la mayoría de los tumores pancreáticos exocrinos son malignos.

El carcinoma de páncreas, particularmente el carcinoma de páncreas exocrino y mucho más particularmente el más frecuente, que es el adenocarcinoma ductal, se encuentra entre las cinco causas de muerte más frecuentes en varones, y es la cuarta causa de muerte en mujeres. Es uno de los tumores de pronóstico más desfavorable, con una supervivencia de solo 5% en varones y 6% en las mujeres 5 años después del diagnóstico. La incidencia más alta se produce entre los 60-70 años de edad (AIOM. Linea Guida Carcinoma del Pancreas Esocrino, ed. 2013).

La etiología del carcinoma de páncreas exocrino es desconocida. Existe una predisposición genética reconocida (familiaridad) y algunos factores de riesgo tales como el tabaco, una dieta grasa, la diabetes mellitus tipo 2, la pancreatitis crónica, factores ambientales tales como disolventes o plaguicidas.

El carcinoma del páncreas exocrino es, en su estadio inicial, asintomático, y esto explica el retraso en el diagnóstico, que habitualmente se realiza cuando la enfermedad está en un estadio avanzado, con la excepción de la detección accidental durante procedimientos de diagnóstico para otras enfermedades abdominales.

Los pacientes diagnosticados con cáncer pancreático tienen un mal pronóstico: considerando el retraso descrito anteriormente en el diagnóstico, solo aproximadamente 15% de los casos muestran el tumor limitado al páncreas, mientras que, en los casos restantes, la difusión de los nódulos linfáticos locorregionales se detecta en aproximadamente 25% de los pacientes, y la presencia de metástasis se detecta en 60% de los casos.

La supervivencia media desde el diagnóstico del cáncer es de aproximadamente tres a seis meses, mientras que una supervivencia de cinco años es significativamente menor del 5%.

La terapia del carcinoma del páncreas es la cirugía, cuando sea posible, también con propósitos paliativos.

La pancreaticoduodenectomía radical es la única posibilidad de curación, especialmente para una enfermedad mínima.

La terapia médica, también asociada con la radioterapia, se limita a los casos inextirpables, o cuando están presentes metástasis, o como tratamiento adyuvante después de la cirugía. Aunque existen informes ocasionales de pacientes individuales que responden a la gemcitabina o el fluorouracilo, o regímenes combinados con doxorubicina, metotrexato, cisplatino, oxaliplatino, irinotecano, erlotinib, etc., los resultados de la quimioterapia son generalmente insatisfactorios y a menudo no mejores que la ausencia total de tratamiento (Martindale, 31 ed., página 530).

Theve *et al*, en 1983, revisaron los posibles efectos de las hormonas sexuales sobre el páncreas, basándose en informes sobre proteínas receptoras esteroideas en tejido pancreático, la alta capacidad de proteína que se une a estrógeno en el páncreas humano y la capacidad del tejido pancreático humano de convertir el principal estrógeno periférico, el sulfato de estrona, en el estradiol- 17 beta biológicamente activo terminal.

Con estos antecedentes, probaron el tamoxifeno (un antagonista del receptor estrogénico) en pacientes con adenocarcinoma de páncreas inextirpable con algunos resultados preliminares similares a los de Wong *et al*, en 1993.

La práctica clínica en los años posteriores no dio los resultados esperados, pero la conclusión fue que aunque los antiestrógenos no constituyeran la forma óptima de terapia, se deberían de probar otros tipos de manipulación hormonal en el cáncer pancreático. En vista de lo anterior, existe una necesidad importante de nuevos enfoques de tratamiento de tumores y, en particular, para el tratamiento de carcinomas, y todavía más especialmente para el tratamiento de tumores epiteliales, especialmente carcinoma prostático o carcinoma de páncreas (preferiblemente carcinoma de páncreas exocrino).

Se conoce en la técnica un número de compuestos denominados 17 α -monoésteres, 21-monoésteres y 17 α ,21-diésteres de cortexolona y procedimientos para su fabricación. El documento WO03/014141 describe que los compuestos pertenecientes a la familia de esteroides estructuralmente relacionados con cortexolona (también conocida como 11-desoxicortisona) tienen principalmente actividad antiandrogénica. Estos compuestos, tales como 17 α -propionato de cortexolona, actúan al interferir con la acción directa de las hormonas androgénicas sobre el receptor androgénico (AR) en los tejidos.

El documento WO2007/031349 divulga 17 α -ésteres C₃-C₁₀ de 9,11-deshidrocortexolona, un derivado relacionado estructuralmente con la cortexolona, como agente antigonadotrófico, que pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos estrechamente relacionados con el exceso de producción de gonadotropina.

El documento WO2009/019138 divulga un procedimiento enzimático para la obtención de 17 α -monoésteres de cortexolona y de 9,11-deshidrocortexolona; por otra parte, también se divulga la existencia de varias formas cristalinas de 17 α -propionato de cortexolona, a saber la forma cristalina I, la forma II, la forma III y la forma de hidrato IV, y ciertos procedimientos para obtenerlas.

El acetato de ciproterona (abreviado como CPA) es un esteroide sintético, que se consideraba la terapia estándar para el tratamiento de tumores sensibles a andrógenos, especialmente el cáncer de próstata. La terapia estándar con acetato de ciproterona resultaba bastante ineficaz en los tumores con expresión reducida, o ausente, de receptor androgénico (Br. J. Cancer (1989), 60, 789-792).

Se sabe en la técnica que la presencia de 17 α -esterificación confiere a los 17 α -ésteres de cortexolona diferentes actividades antiandrogénicas, demostradas en animales (Celasco et al., *Arzneim-Forsch* 2005; 5: 581-7).

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que los 17 α (alfa)-monoésteres, 21-monoésteres y 17 α (alfa),21-diésteres de cortexolona tienen efectos antitumorales inesperados, tanto en líneas celulares aisladas *in vitro* como en el modelo de cáncer de próstata y pancreático xenoinjertado *in vivo* en los animales.

El efecto antitumoral de la invención era evidente tanto en células de carcinoma que alojan receptor androgénico (AR⁺), tal como en el caso de células de cáncer de próstata LNCaP o un grupo de células de cáncer pancreático Panc1, como, muy sorprendentemente, también en células con expresión ausente, o reducida, del receptor androgénico (AR⁻), como células de cáncer de próstata PC3, o células de cáncer pancreático MiaPaca. El efecto antitumoral de la invención también era evidente en carcinomas mamarios (AR⁻) y carcinomas del tracto gastrointestinal (AR⁻).

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá ahora mediante las siguientes figuras y ejemplos no limitantes.

Figura 1: Cambio medio en número de veces en el volumen del tumor pancreático, medido con relación al inicio del tratamiento subcutáneo (SC), en el modelo en animales xenoinjertados de ratones lampiños (línea de células pancreáticas MiaPaca) con 17 α -benzoato de cortexolona (en la figura indicado como "06" y como "CB-03-06") a dosis baja (230 μ M) y a dosis alta (1150 μ M). La referencia a "Vehículo" es un grupo tratado con control con 0,4% (v/v) de Tween 80 y 0,5% (p/v) de carboximetilcelulosa en solución salina normal. Los ratones se trataron con el compuesto y vehículo SC diariamente durante 28 días consecutivos. La flecha de final del tratamiento se refiere al día en el que se terminaba el tratamiento.

Figura 2: Cambio medio en número de veces en el volumen del tumor pancreático, medido con relación al inicio del tratamiento SC, en el modelo en animales xenoinjertados de ratones lampiños (línea de células pancreáticas MiaPaca) con 17 α -valerato-21-propionato de cortexolona (en la figura indicado como "10" y como "CB-03-10") a dosis baja (230 μ M) y a dosis alta (1150 μ M). La referencia a "Vehículo" es un grupo tratado con control con 0,4% (v/v) de Tween 80 y 0,5% (p/v) de carboximetilcelulosa en solución salina normal. Los ratones se trataron con el compuesto y vehículo SC diariamente durante 28 días consecutivos. La flecha de final del tratamiento se refiere al día en el que se terminaba el tratamiento.

Figura 3: Cambio medio en número de veces en el volumen del tumor pancreático con relación al inicio del tratamiento SC en el modelo en animales de ratones lampiños (línea de células pancreáticas MiaPaca) tratados con acetato de ciproterona (en la figura indicado como CPA), 17 α -valerato-21-propionato de cortexolona (en la figura indicado como "10") y 17 α -benzoato de cortexolona (en la figura indicado como "06") (cada compuesto en dosis baja y en dosis alta) y con grupo de control tratado con vehículo (es decir, 0,4% (v/v) de Tween 80 y 0,5% (p/v) de carboximetilcelulosa en solución salina normal). Todos los ratones se trataron con el compuesto y vehículo SC diariamente durante 28 días consecutivos (días de tratamiento). La flecha de final del tratamiento se refiere al día en el que se terminaba el tratamiento.

Figura 4: Gráfica que muestra valores de P frente al grupo tratado con vehículo (es decir 0,4% (v/v) de Tween 80 y 0,5% (p/v) de carboximetilcelulosa en solución salina normal) de las mejores dosis procedentes de la Figura 3. Todos los ratones se trataron con el compuesto y vehículo SC diariamente durante 28 días consecutivos (días de tratamiento). La flecha de final del tratamiento se refiere al día en el que se terminaba el tratamiento.

Figura 5: Valoración de dosis de citotoxicidad de compuestos derivados de cortexolona en líneas celulares de cáncer de próstata (a) y pancreático (b) humanos.

Figura 6: Niveles de expresión del receptor androgénico en líneas celulares de cáncer.

Figura 7: Actividad antagonista para glucocorticoides de CB-03-10 y CB-03-05. Se usa mifepristona como control positivo (potente antagonista glucocorticoides)

Figura 8: Actividad antagonista para glucocorticoides de CB-03-10 y CB-03-05, se usa dexametasona (Dex) como control positivo (potente antagonista glucocorticoides)

Figura 9: Inducción por CB-03-10 de la apoptosis en células MiaPaca2.

Figura 10: Inducción de la interrupción del ciclo celular por diferentes concentraciones de CB-03-10 en células MiaPaca2.

Figura 11: Transcurso del tiempo de la activación de caspasas en células MiaPaca2 (8-24-48 horas). 20 μ M (barras rayadas) o 50 μ M (barras sólidas) indican las concentraciones de compuestos. La gemcitabina es un potente fármaco citotóxico antipancrático usado y control positivo.

Figura 12: Activación de caspasa sobre líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP.

Figura 13: metabolismo *in vitro* de CB-03-10 y CB-03-05 en plasma humano (A) y de rata (B).

Figura 14: Farmacocinéticas de CB-03-10 y CB-03-05 evaluadas *in vivo* en plasma de ratones después de la administración subcutánea y oral.

Figura 15: Actividad antitumoral *in vivo* de CB-03-10 en el modelo de xenoinjerto en ratones de cáncer pancreático cuando se administra subcutáneamente.

Figura 16: Actividad antitumoral *in vivo* de CB-03-10 en un modelo de xenoinjerto en ratones de cáncer de próstata cuando se administra mediante sonda oral. La enzalutamida (Enza), un potente fármaco citotóxico antiprostático, se usa como control positivo. Los presentes resultados muestran que el CB-03-10 frente a

vehículo es significativamente diferente estadísticamente del día 7 hasta el día 60. En contraste, enzalutamida frente a vehículo es estadísticamente significativo sólo los días 14 y 25.

Esta comparación muestra que CB-03-10 alcanza una alta significación estadística frente al vehículo mientras que la enzalutamida no alcanza significación estadística frente al vehículo.

Figura 17: Inhibición por CB-03-10 y CB-03-05 de la secreción de PSA de referencia *in vitro* desde líneas celulares cancerosas LNCaP.

Figura 18: Expresión de receptores androgénico y glucocorticoideo en diferentes líneas celulares de cáncer.

Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos de la técnica, las notaciones y otra terminología científica usados en la presente memoria están destinados a tener los significados entendidos comúnmente por los expertos en la técnica de la que trata esta divulgación. En algunos casos, los términos con significados entendidos comúnmente se definen en la presente memoria por claridad y/o por referencia fácil; así, no se debe considerar que la inclusión de estas definiciones en la presente memoria represente una diferencia sustancial sobre lo que normalmente se entiende en la técnica.

En particular, los términos "excipiente fisiológicamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refieren en la presente memoria a una sustancia carente de cualquier efecto farmacológico por sí misma y que no produzca reacciones adversas cuando se administre a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Los excipientes fisiológicamente aceptables son muy conocidos en la técnica y se divulgan, por ejemplo, en the Handbook of Pharmaceutical Excipients, sexta edición (2009), incorporado en la presente memoria por referencia.

El término "alquilo", según se usa en la presente memoria, significa un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada.

El término "arilo" se refiere en la presente memoria a sistemas anulares aromáticos mono- y policarbocíclicos, en los que los anillos carbocíclicos individuales de los sistemas anulares policarbocíclicos pueden estar condensados o unidos entre sí a través de un enlace sencillo. Grupos "arilo" adecuados comprenden, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, bifenilo y similares.

El término "heteroarilo" se refiere en la presente memoria a un sistema anular aromático mono- y policarbocíclico que comprende al menos un heteroátomo en el sistema, en donde dicho heteroátomo se selecciona del grupo que comprende, pero no limitado a, nitrógeno, azufre, oxígeno y similares, y en donde los anillos cíclicos individuales de los sistemas anulares policarbocíclicos pueden estar condensados o unidos entre sí a través de un enlace sencillo. Grupos "heteroarilo" adecuados comprenden, pero no se limitan a, piridilo, imidazolilo, pirrolilo, furilo, bencimidazolilo, tiofuranilo y similares.

Los grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos en al menos uno de los átomos de carbono del anillo con un grupo seleccionado de alquilo inferior, alquenilo inferior, haloalquilo inferior, haloalquenilo inferior, alcoxi inferior, halcalquenilo inferior, alqueniloxi inferior, halógeno, nitro, ciano, alquiltio inferior y similares.

Los grupos heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos en al menos uno de los átomos de carbono o en al menos uno de los heteroátomos del anillo con un grupo seleccionado de alquilo inferior, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, alquenilo inferior, halcalquenilo inferior, alqueniloxi inferior, halógeno, nitro, ciano, alquiltio inferior y similares.

El término "aproximadamente" se refiere en la presente memoria al intervalo del error experimental que se puede producir en una medida.

Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se han de entender como términos abiertos (es decir que significan "incluyendo, pero no limitado a") y se ha de considerar que también incluyen y/o proporcionan apoyo para términos como "consiste esencialmente en", "que consiste esencialmente en", "consiste en" o "que consiste en".

Los términos "consiste esencialmente en", "que consiste esencialmente en" se han de considerar términos semicerrados, lo que significa que no se incluyen otros ingredientes que afecten materialmente a las características básicas y nuevas de la invención (se pueden así incluir excipientes opcionales).

Los términos "consiste en", "que consiste en" se han de considerar un término cerrado.

Según se usa en la presente memoria, los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a una cantidad suficiente para provocar la respuesta biológica deseada. En la presente invención, la respuesta biológica deseada es inhibir, reducir o mejorar la gravedad, la duración, la progresión o el comienzo de una enfermedad, un trastorno o una afección, prevenir el avance, la recaída o la progresión de una enfermedad, un trastorno o una afección o un síntoma asociado con una enfermedad, un trastorno o una afección. La cantidad

precisa de compuesto administrada a un sujeto dependerá del modo de administración, del tipo y la gravedad de la enfermedad, el trastorno o la afección y de las características del sujeto, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a fármacos. El experto será capaz de determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Las dosificaciones adecuadas son conocidas para agentes aprobados y pueden ser ajustadas por el experto según la afección del sujeto, el tipo de afección o afecciones que se traten y la cantidad que se use de un compuesto descrito en la presente memoria. En los casos en los que no se apunte expresamente una cantidad, se debe suponer una cantidad eficaz. Por ejemplo, los compuestos y las composiciones farmacéuticas descritos en la presente se pueden administrar a un sujeto en un intervalo de dosificación de entre aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal/día para un tratamiento terapéutico.

Según se usan en la presente, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a tratamiento terapéutico incluyendo la reducción o mejora de la progresión, la gravedad y/o la duración de una enfermedad, un trastorno o una afección, o la mejora de uno o más síntomas (específicamente, uno o más síntomas discernibles) de una enfermedad, un trastorno o una afección, resultantes de la administración de una o más terapias (p. ej., uno o más agentes terapéuticos siendo el compuesto como se define en las reivindicaciones). En realizaciones específicas, el tratamiento terapéutico incluye la mejora de al menos un parámetro físico medible de una enfermedad, un trastorno o una afección. En otras realizaciones, el tratamiento terapéutico incluye la inhibición de la progresión de una afección, bien físicamente mediante, p. ej., la estabilización de un síntoma discernible, bien fisiológicamente mediante, p. ej., la estabilización de un parámetro físico, o bien ambos. En otras realizaciones, el tratamiento terapéutico incluye la reducción o la estabilización de una enfermedad, un trastorno o una afección. El término "tratamiento curativo", según se usa en la presente memoria, se refiere a un tratamiento que tiene por objeto curar una enfermedad o mejorar síntomas asociados con una enfermedad.

El término "tratamiento paliativo", según se usa en la presente memoria, se refiere a un tratamiento o una terapia que no tenga por objeto curar una enfermedad sino en cambio proporcionar alivio.

El término "tratamiento adyuvante", según se usa en la presente memoria, se refiere a un tratamiento que se da además del tratamiento primario, principal o inicial.

El término "tratamiento neoadyuvante", según se usa en la presente memoria, se refiere a un tratamiento que se da antes de un tratamiento principal, con objeto de reducir el tamaño o la extensión de un tumor, reduciendo así las consecuencias de una técnica de tratamiento más extensiva que se requeriría si el tumor no se hubiera reducido en tamaño o extensión.

El término "administración simultánea, separada o secuencial" se refiere en la presente memoria a la administración del primer y el segundo compuesto al mismo tiempo o de tal modo que los dos compuestos actúen en el cuerpo del paciente al mismo tiempo o la administración de un compuesto después del otro compuesto de tal modo que se proporcione un efecto terapéutico. En algunas realizaciones, los compuestos se toman con una comida. En otras realizaciones, los compuestos se toman después de una comida, tal como 30 minutos o 60 minutos después de una comida. En algunas realizaciones, un compuesto se administra a un paciente durante un período de tiempo seguido por la administración del otro compuesto.

Según se usan en la presente memoria, los términos "sujeto" y "paciente" se usan intercambiabilmente. Los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a un animal (p. ej., un ave tal como un pollo, una codorniz o un pavo, o un mamífero), específicamente un "mamífero" incluyendo un animal distinto de un primate (p. ej., una vaca, un cerdo, un caballo, una oveja, un conejo, una cobaya, una rata, un gato, un perro y un ratón) y un primate (p. ej., un mono, un chimpancé y un ser humano), y más específicamente un ser humano. En una realización, el sujeto es un ser humano.

Descripción detallada de la invención

Se ha descubierto ahora sorprendentemente que un derivado de cortexolona específico, a saber su 17.alfa.-valerato, tiene propiedades antitumorales terapéuticamente interesantes, contra determinados tumores como se define en la presente memoria. De acuerdo con el concepto general, la invención se representa por el compuesto 17.alfa.-valerato de cortexolona (véanse las fórmulas dadas anteriormente), para su uso en el tratamiento de carcinoma de próstata, carcinoma mamario, carcinoma pancreático, carcinoma pulmonar, carcinoma del tracto gastrointestinal, cáncer de riñón, carcinoma tiroideo, carcinoma uterino o carcinoma adrenal; y en donde el carcinoma de próstata es resistente a terapia dirigida con anti andrógenos.

A menos que se indique otra cosa, todas las formas tautómeras de los compuestos de la invención están dentro del alcance de la invención.

Adicionalmente, a menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en la presente memoria también están destinadas a incluir compuestos que difieran solamente en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, compuestos que tienen las presentes estructuras excepto por la sustitución de hidrógeno por deuterio o tritio o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C están dentro del alcance

de esta invención. Estos compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas o sondas analíticas en ensayos biológicos. Estos compuestos, especialmente los análogos deuterados, también pueden ser terapéuticamente útiles.

Los compuestos mencionados en la presente memoria se definen en la presente memoria por sus estructuras químicas y/o nombres químicos. Cuando un compuesto se mencione tanto por su estructura química como por un nombre químico, y la estructura química y el nombre químico entren en conflicto, la estructura química es determinante de la identidad del compuesto.

Sales, solvatos, clatratos, profármacos y otros derivados farmacéuticamente aceptables

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden existir en forma libre o, cuando sea apropiado, como sales. Las sales que son farmacéuticamente aceptables son de particular interés ya que son útiles para administrar los compuestos descritos posteriormente con propósitos médicos. Sales que no son farmacéuticamente aceptables son útiles en procedimientos de fabricación, con propósitos de aislamiento y purificación y, en algunos casos, para el uso en la separación de formas estereoisómeras de los compuestos en cuestión o productos intermedios de los mismos.

Según se usa en la presente memoria, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de un compuesto que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuadas para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin efectos secundarios excesivos, tales como toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y están de acuerdo con una relación beneficio/riesgo razonable.

Sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge *et al.*, describen con detalle sales farmacéuticamente aceptables en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19. Sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente memoria incluyen las derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos adecuados. Estas sales se pueden preparar in situ durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos. Se debe entender que la presente descripción incluye mezclas/combinaciones de diferentes sales farmacéuticamente aceptables y también mezclas/combinaciones de compuestos en forma libre y sales farmacéuticamente aceptables.

Además de los compuestos descritos en la presente memoria, solvatos (p. ej., hidratos) y clatratos farmacéuticamente aceptables de estos compuestos también se pueden emplear en composiciones para tratar o prevenir los trastornos identificados en la presente memoria.

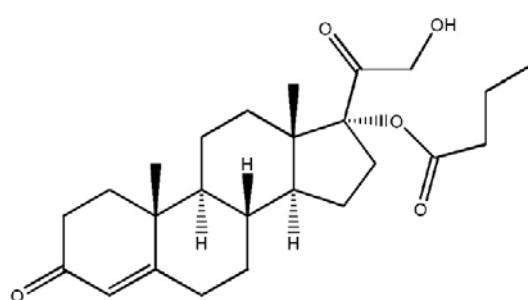
Según se usa en la presente memoria, el término "solvato farmacéuticamente aceptable" es un solvato formado a partir de la asociación de una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptable con uno de los compuestos descritos en la presente memoria. El término solvato incluye hidratos (p. ej., hemihidrato, monohidrato, dihidrato, trihidrato, tetrahidrato y similares).

Según se usa en la presente memoria, el término "hidrato" significa un compuesto descrito en la presente memoria o una sal del mismo que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de agua unida por fuerzas intermoleculares no covalentes.

Según se usa en la presente memoria, el término "clatrato" significa un compuesto descrito en la presente memoria o una sal del mismo en la forma de una red cristalina que contienen espacios (p. ej., canales) que tienen una molécula huésped (p. ej., un disolvente o agua) atrapada dentro.

Usos médicos

El objetivo de la presente invención es 17 α -valerato de cortexolona (también denominado en la presente memoria "05" o "CB-03-05"), representado por:



(CB-03-05 (17 α -valerato de cortexolona))

para el uso en el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente y también mencionadas en las

reivindicaciones.

En otra realización, la presente invención son composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden 17.alfa.-valerato de cortexolona para el uso como un medicamento en el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente y también mencionadas en las reivindicaciones.

En una realización preferida de la invención divulgada en la presente memoria, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata. En una realización preferida de la invención divulgada en la presente memoria, el cáncer de próstata es un adenocarcinoma. En una realización preferida de la invención divulgada en la presente memoria, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con expresión de AR ausente o reducida. En otra realización preferida de la invención, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con receptores androgénicos mutados o truncados.

Idealmente, 17 α -valerato de cortexolona (CB-03-05) es para el uso como un agente antitumoral donde las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con receptores androgénicos mutados o truncados. De acuerdo con la invención, 17 α -valerato de cortexolona (CB-03-05) es para el uso en el tratamiento de cánceres de próstata que son o se hacen resistentes a tratamiento antiandrogénico, tal como enzalutamida. Esta es una realización particularmente ventajosa ya que se ha encontrado recientemente que después de 6 meses de tratamiento 30% de los cánceres de próstata se hacen resistentes a enzalutamida debido a que el AR ha mutado o cambiado. De forma interesante, estas células cancerosas resistentes regulan al alza el GR. 17 α -valerato de cortexolona (CB-03-05), se pueden usar para tratar estos cánceres de modo que la actividad también esté mediada a través del GR.

En una realización preferida de la invención divulgada en la presente memoria, el carcinoma pancreático exocrino es un adenocarcinoma. En una realización preferida, el cáncer pancreático exocrino tiene expresión ausente o reducida del AR.

En una realización preferida de la invención divulgada en la presente memoria, dicho tumor epitelial es carcinoma del tracto gastrointestinal (preferiblemente carcinoma de colon).

En una realización preferida más de la invención divulgada en la presente memoria, dicho tumor epitelial es carcinoma mamario (preferiblemente cáncer de mama triple negativo). Opcionalmente, el sujeto o paciente que se trata es uno que no responde al tratamiento o uno que recae del tratamiento convencional.

En una realización preferida de la invención divulgada en la presente memoria, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con expresión mutada, ausente o reducida del AR.

En una realización preferida de la invención divulgada en la presente memoria, el carcinoma pancreático exocrino es un adenocarcinoma. En una realización preferida, el cáncer pancreático exocrino tiene expresión ausente o reducida del AR.

Preferiblemente, dicho sujeto es un mamífero. Preferiblemente, dicho mamífero es un ser humano.

Una ilustración de las propiedades farmacológicas de los compuestos de la invención se encontrará posteriormente en la sección experimental.

17 α -valerato de cortexolona (CB-03-05) se puede preparar según el método divulgado en el ejemplo 11.

Composiciones farmacéuticas

Los compuestos descritos en la presente se pueden formular en composiciones farmacéuticas que comprenden además un portador, diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende 17.alfa.-valerato de cortexolona para su uso en el tratamiento de las enfermedades especificadas anteriormente y también en las reivindicaciones y un portador, diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de este compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un portador, diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, diluyentes, excipientes o portadores farmacéuticos seleccionados adecuadamente con respecto a la forma de administración pretendida, y de acuerdo con prácticas farmacéuticas convencionales.

Según la realización más preferida, dicha composición farmacéutica para los usos anteriormente mencionados comprende, como ingrediente activo, 17 α -valerato de cortexolona (CB-03-05) en asociación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

En una realización preferida de la invención divulgada en la presente memoria, las afecciones a tratar son carcinoma de próstata como se define en las reivindicaciones y carcinoma pancreático, más preferiblemente carcinoma pancreático exocrino o carcinoma mamario, tal como cáncer de mama triple negativo. En otra realización preferida

de la invención, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con receptores androgénicos mutados o truncados. Idealmente, las composiciones farmacéuticas que comprenden 17 α -valerato de cortexolona (CB-03-05), son para el uso como un agente antitumoral donde las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con receptores androgénicos mutados o truncados. De este modo, el cáncer de próstata que se trata según la invención es o se ha vuelto resistente a una terapia antiandrogénica dirigida, tal como enzalutamida.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la invención pueden estar en forma aislada, tal como, a modo de ejemplo, polvos, polvos criosecados, gránulos, pellas, comprimidos o cápsulas. Si se desea, también se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes. El compuesto activo también puede estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con revestimientos y envueltas tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos muy conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Excipientes apropiados para composiciones farmacéuticas sólidas se pueden seleccionar, sin ninguna limitación, entre categorías conocidas para un experto en la técnica tales como adsorbentes, cargas, tensioactivos, adyuvantes de compresión, aglutinantes, lubricantes, desintegrantes, diluyentes, disgregantes, agentes promotores del flujo, agentes de criosecado, deslizantes, adyuvantes de liofilización, agentes pelculígenos, tintes, antioxidantes y similares. A modo de ejemplo, excipientes adecuados para composiciones farmacéuticas sólidas se pueden seleccionar, de un modo no limitativo, de fosfato cálcico, estearato magnésico, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa y derivados de la misma, polivinilpirrolidona, agentes de revestimiento, tintes y cera. Cualquier mezcla de estos excipientes se puede usar apropiadamente según la invención.

Según la invención, composiciones farmacéuticas sólidas tales como comprimidos, gránulos, pellas, cápsulas y similares se pueden formular como formas de liberación inmediata o como formas de liberación retardada o como formas de liberación controlada o como formas de liberación extendida o como formas de liberación prolongada, y son adecuadas para la vía de administración oral o sublingual o como un implante.

La composición controlada, extendida y/o prolongada se puede preparar según cualquier método o sistema convencional, por ejemplo según el documento WO00/76478.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la invención también pueden estar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, emulsiones, suspensiones o jarabes. Formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del compuesto activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también incluyen adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes. Excipientes apropiados para una composición farmacéutica líquida se pueden seleccionar, sin ninguna limitación, entre las categorías bien conocidas para un experto en la técnica, tales como disolventes, codisolventes, vehículos oleaginosos, agentes tamponadores, tensioactivos, agentes emulsionantes, agentes mejoradores de la solubilidad, agentes de suspensión, agentes solubilizadores, agentes quelantes, agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, antioxidantes, conservantes, agentes osmóticos, agentes de tonicidad, agentes de control de la viscosidad y similares. A modo de ejemplo, excipientes farmacéuticos adecuados para una preparación líquida se pueden seleccionar de agua para inyecciones, disolventes o codisolventes orgánicos tales como etanol, glicoles y glicerol y mezclas de los mismos, aceites naturales tales como aceite de soja, triglicéridos de cadena media, 15-hidroxiestearato de polioxilo, polisorbato 80, polioxil-35-aceite de ricino, cloruro sódico, fosfato sódico, fosfato potásico, y similares. Según la invención, dichas composiciones farmacéuticas líquidas pueden ser estériles o no estériles. En una realización, las composiciones farmacéuticas líquidas se esterilizan terminalmente por medio de una técnica muy conocida para un experto en la especialidad, tal como esterilización con calor seco, esterilización con calor húmedo, radiación gamma, esterilización con rayos e y similares. En otra realización, las composiciones farmacéuticas líquidas se esterilizan mediante filtración estéril y se cargan asépticamente en los recipientes de envasado principales finales. Las composiciones farmacéuticas líquidas para su uso según la invención divulgada en la presente memoria se pueden usar como inyecciones, infusiones o perfusiones tales como administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o intratumoral.

Métodos de administración

El compuesto y las composiciones descritos en la presente memoria se pueden administrar oralmente, parenteralmente, mediante un aerosol de inhalación, tópicamente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, vaginalmente o a través de un depósito implantado. El término "parenteral", según se usa en la presente memoria, incluye, pero no se limita a, técnicas de inyección o infusión subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraarticulares, intrasinoviales, intraesternales, intratecales, intrahepáticas, intralesionales e intracraneales.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, se pueden formular según la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico parenteralmente aceptable. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana, o al incorporar agentes esterilizantes en la

forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes del uso.

Formas inyectables estériles de los compuestos y las composiciones descritos en la presente memoria pueden ser una suspensión acuosa u oleaginosa. Las suspensiones se pueden formular según técnicas conocidas en la especialidad usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico parenteralmente aceptable.

El compuesto para su uso en los métodos de la invención se pueden formular en forma de dosificación unitaria. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas como dosificación unitaria para sujetos sometidos a tratamiento, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, opcionalmente en asociación con un portador farmacéutico adecuado. La forma de dosificación unitaria puede ser para una sola dosis diaria o una de múltiples dosis diarias (p. ej., de aproximadamente 1 a 4 o más veces al día). Cuando se usan múltiples dosis diarias, la forma de dosificación unitaria puede ser igual o diferente para cada dosis.

Según la invención, el 17.alfa.-valerato de cortexolona o las composiciones farmacéuticas que lo comprenden son preferiblemente para administración mediante inyección intravenosa, más preferiblemente a través de una bolsa de infusión o una jeringa o un catéter de bomba, o mediante inyección intramuscular, o mediante inyección subcutánea, o por vía oral (por boca) en formas de comprimidos o cápsulas.

Según una realización, dicha composición farmacéutica está en forma líquida y es adecuada para inyección, y comprende 17.alfa.-valerato de cortexolona en una cantidad que varía de 0,1% a 50,0% por ciento en volumen (p/v), preferiblemente de 0,25% a 25% p/v, más preferiblemente de 0,5% a 10% p/v, mucho más preferiblemente de 1% a 5% p/v.

Según otra realización, dicha composición farmacéutica está en forma sólida y comprende 17.alfa.-valerato de cortexolona en una cantidad que varía de 0,1% a 50% de peso en peso (p/p), preferiblemente de 0,5% a 40% p/p, más preferiblemente de 1% a 30% p/p.

La cantidad de 17.alfa.-valerato de cortexolona en dicha composición farmacéutica es tal que se puede obtener un nivel de dosificación eficaz al administrar a un mamífero que sufre las afecciones especificadas anteriormente y en las reivindicaciones. El 17.alfa.-valerato de cortexolona y la composición farmacéutica que comprende el mismo como ingredientes activos antitumorales para el uso en el tratamiento curativo o adyuvante o neoadyuvante o paliativo de las enfermedades especificadas anteriormente y en las reivindicaciones, incluyendo neoplasias malignas y metástasis, se administran preferiblemente a un mamífero, siendo dicho mamífero un ser humano o un animal, preferiblemente un ser humano.

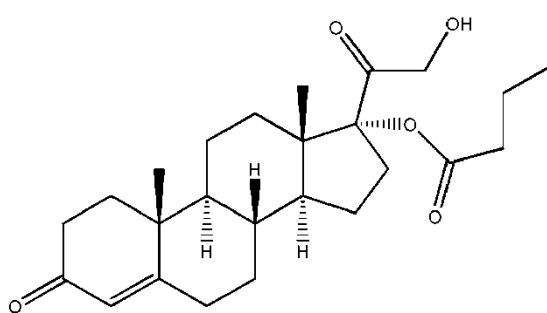
Terapia de combinación

Según otra realización, los compuestos, las composiciones y las composiciones farmacéuticas pueden contener al menos otro ingrediente activo, preferiblemente un ingrediente activo quimioterapéutico, como una combinación para administración simultánea, separada o secuencial.

En ciertas realizaciones, 17.alfa.-valerato de cortexolona y la composición farmacéutica que comprende 17.alfa.-valerato de cortexolona y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable según la invención se pueden usar en una terapia de combinación con al menos otro fármaco, especialmente un fármaco quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, el 17.alfa.-valerato de cortexolona se puede administrar paralelamente con la administración de otro fármaco, especialmente un fármaco quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, el 17.alfa.-valerato de cortexolona se puede administrar antes de o posteriormente a la administración de otro fármaco, especialmente un fármaco quimioterapéutico. Dicho al menos otro fármaco, especialmente un fármaco quimioterapéutico, puede ser eficaz para tratar una enfermedad, un trastorno o una afección igual o diferente. Métodos descritos en la presente memoria incluyen administración de 17.alfa.-valerato de cortexolona o composiciones farmacéuticas que lo comprenden y al menos otro fármaco, preferiblemente un fármaco quimioterapéutico, con la condición de que la administración combinada no inhiba la eficacia terapéutica del uno o más compuestos de la presente invención y/o no produzca efectos adversos inaceptables de la combinación.

17α-Valerato de cortexolona (también denominado en la presente memoria "05" o "CB-03-05")

Según se describe anteriormente el objetivo de la presente invención es 17α-valerato de cortexolona (también denominado en la presente memoria "05" o "CB-03-05"), representado por:



CB-03-05 (17α-valerato de cortisolona)

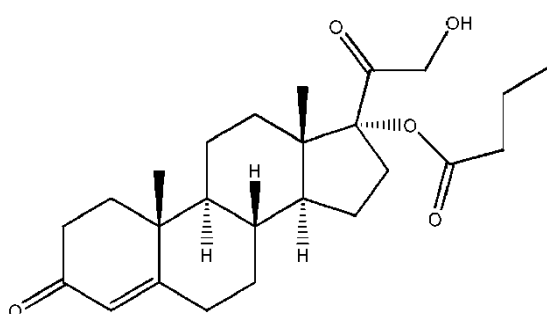
para el uso en el tratamiento de las afecciones especificadas anteriormente y en las reivindicaciones. Una realización preferida de la invención, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con receptores androgénicos mutados o truncados. De este modo, el cáncer de próstata que se puede tratar con un medicamento según la invención es o se ha vuelto resistente a terapia antiandrogénica dirigida, tal como enzalutamida.

Según otra realización, la afección es carcinoma pancreático, preferiblemente carcinoma pancreático exocrino.

Según una realización, la afección es carcinoma mamario, preferiblemente cáncer de mama triple negativo (TNBC). En una realización, el carcinoma mamario es cáncer de mama triple negativo y el sujeto es uno que ha recaído o uno que responde mal al tratamiento con terapia convencional.

Según otra realización, la afección es carcinoma del tracto gastrointestinal, tal como carcinoma de colon.

Según otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la siguiente fórmula estructural:



y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable para el uso como un medicamento, en el tratamiento de las afecciones especificadas anteriormente y en las reivindicaciones.

En otra realización preferida de la invención, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con receptores androgénicos mutados o truncados. De este modo, el cáncer de próstata que se puede tratar según la invención es o se ha vuelto resistente a una terapia antiandrogénica dirigida, tal como enzalutamida.

Según otra realización, la afección es son carcinoma pancreático, preferiblemente carcinoma pancreático exocrino.

Según otra realización, la afección es son carcinoma mamario, preferiblemente cáncer de mama triple negativo (TNBC). En una realización, el carcinoma mamario es cáncer de mama triple negativo y el sujeto es uno que ha recaído o uno que responde mal al tratamiento con terapia convencional.

Según otra realización, la afección es carcinoma del tracto gastrointestinal, tal como carcinoma de colon.

La composición farmacéutica también puede comprender al menos otro ingrediente activo, preferiblemente un ingrediente activo quimioterapéutico, para la administración simultánea, separada o secuencial.

Preferiblemente, el sujeto es un mamífero. Idealmente, el mamífero es un ser humano.

Ejemplos

De los siguientes ejemplos, solo aquellos que se refieren a o que soportan la actividad del compuesto 17.alfa.-valerato de cortisolona en el tratamiento de las afecciones especificadas en las reivindicaciones constituyen

ejemplos de la presente invención.

Ejemplo 1: actividad antitumoral *in vitro* de 17 α -benzoato de cortexolona (CB-03-06)

sobre líneas celulares de cáncer de próstata

El experimento se realizó para probar y para definir la actividad antitumoral *in vitro* de 17 α -benzoato de cortexolona sobre LNCaP (AR⁺) y PC3 (AR⁻), representativas de líneas celulares de cáncer de próstata con expresión positiva o negativa de receptor androgénico (AR), respectivamente. El método experimental consistía en:

1. Se sembraron 3000 células cancerosas en placas de fondo plano de 96 pocillos en medio completo que contenía 2% de suero bovino tratado con carbón vegetal.
2. Después de 24 horas, se añadió a los cultivos DHT (dihidrotestosterona) 10 nM con o sin compuestos antiandrogénicos, o vehículo de DMSO (control negativo).
3. Después de 3 días, los números de células viables se cuantificaron usando un ensayo de proliferación dependiente de ATP.

El objetivo de la prueba era determinar la concentración a la que cada compuesto destruye 50% de las células cancerosas (IC₅₀) en vista de una aplicación potencial del compuesto en una prueba *in vivo* en animales.

Los datos procedentes del Experimento 1 se ajustaron a través de curvas de respuesta a las dosis sigmoideas y se analizaron usando el software de análisis estadístico Prism. Los datos procedentes del Experimento 2 se analizaron usando un ajuste de la curva minimocuadrático de regresión no lineal en el software análisis estadístico Prism.

El valor de IC₅₀ encontrado para cada línea se presenta en la siguiente tabla, en comparación con comparadores muy conocidos, el esteroide antiandrogénico más potente, CPA, y enzalutamida, un inhibidor del receptor androgénico oral capaz de prolongar la supervivencia en hombres con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración actualmente usado para tratar el cáncer de próstata. Siguen los resultados procedentes de 2 grupos de experimentos.

Experimento 1

Los resultados se ajustaron a través de curvas de respuesta a las dosis sigmoideas en el software de análisis estadístico Prism.

Líneas celulares tumorales	IC ₅₀ (microM) CB-03-06 [17 α -benzoato de cortexolona]	IC ₅₀ (microM) Acetato de ciproterona	IC ₅₀ (microM) Enzalutamida
LNCaP	12	29	40
PC 3	29	98	208

Los valores de IC₅₀ muestran que la actividad antitumoral del 17 α -benzoato de cortexolona, incluso con una tendencia de correlación débil, se podría considerar no estrictamente dependiente de la expresión de receptor androgénico, de forma diferente a los comparadores.

Experimento 2

Los resultados posteriores incluyen experimentos adicionales a los del Experimento 1. Los resultados se analizaron usando un ajuste de la curva minimocuadrático de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism.

Líneas de células tumorales	IC ₅₀ (microM) CB-03-06 [17 α -benzoato de cortexolona]	IC ₅₀ (microM) Acetato de ciproterona	IC ₅₀ (microM) Enzalutamida
LNCaP	12	22	38
PC3	28	90	180

Ejemplo 2: actividad antitumoral *in vitro* de 17 α -valerato-21-propionato de cortexolona (CB-03-10) sobre líneas celulares de cáncer de próstata

El experimento se realizó para probar y para definir la actividad antitumoral *in vitro* de cortexolona (CB-03-10) sobre LNCaP (AR⁺) y PC3 (AR⁻), representativas de líneas celulares de cáncer prostático con expresión positiva o negativa de AR, respectivamente. El método experimental consistía en:

1. Se sembraron 3000 células cancerosas en placas de fondo plano de 96 pocillos en medio completo que contenía 2% de suero bovino tratado con carbón vegetal.

2. Después de 24 horas, se añadió a los cultivos DHT (dihidrotestosterona) 10 nM con o sin compuestos antiandrogénicos, o vehículo de DMSO (control negativo).
3. Después de 3 días, los números de células viables se cuantificaron usando un ensayo de proliferación dependiente de ATP.

El objetivo de la prueba era determinar la concentración a la que cada compuesto destruye 50% de las células cancerosas (IC₅₀) en vista de una aplicación potencial del compuesto en una prueba *in vivo* en animales.

Los datos procedentes del Experimento 1 se ajustaron a través de curvas sigmoideas de respuesta a la dosis y se analizaron usando el software de análisis estadístico Prism. Los datos procedentes del Experimento 2 se analizaron usando un ajuste de la curva minimocuadrático de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism.

El valor de IC₅₀ encontrado para cada línea se presenta en la siguiente tabla, en comparación con comparadores bien conocidos: el esteroide antiandrogénico más potente, CPA, y enzalutamida, un antagonista de AR oral capaz de prolongar la supervivencia en hombres con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración.

Experimento 1

Los resultados se ajustaron a través de curvas sigmoideas de respuesta a la dosis en el software de análisis estadístico Prism.

Líneas de células tumorales	IC ₅₀ (microM) CB-03-10 [17 α -valerato-21-propionato de cortexolona]	IC ₅₀ (microM) Acetato de ciproterona	IC ₅₀ (microM) Enzalutamida
LNCaP	13	29	40
PC 3	55	98	208

Experimento 2

Los resultados posteriores incluyen experimentos adicionales a los del Experimento 1. Los resultados se analizaron usando un ajuste de la curva minimocuadrático de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism.

Líneas de células tumorales	IC ₅₀ (microM) CB-03-10 [17 α -valerato-21-propionato de cortexolona]	IC ₅₀ (microM) Acetato de ciproterona	IC ₅₀ (microM) Enzalutamida
LNCaP	10	22	38
PC 3	50	90	180

Los valores de IC₅₀ muestran que la actividad antitumoral de 17 α -valerato-21-propionato de cortexolona (CB-03-10) se podría correlacionar con la expresión de receptor androgénico en las líneas celulares.

Ejemplo 3: Actividad antitumoral *in vitro* de 17 α -benzoato de cortexolona (CB-03-06) sobre líneas celulares de cáncer pancreático

El experimento se realizó para probar y para definir la actividad antitumoral *in vitro* de 17 α -benzoato de cortexolona sobre dos líneas celulares de tumor pancreático, Panc1 (AR⁺) y MiaPaca2 (AR bajo), representativas de líneas celulares de cáncer pancreático.

Las líneas también se clasificaron como positivas (AR⁺) o negativas/bajas (AR^{+/-}) a la presencia y la expresión del receptor androgénico.

El método experimental consistía en:

1. Se sembraron 3000 células cancerosas en placas de fondo plano de 96 pocillos en medio completo que contenía 2% de suero bovino tratado con carbón vegetal
2. Después de 24 horas, se añadió a los cultivos DHT (dihidrotestosterona) 10 nM con o sin compuestos antiandrogénicos, o vehículo de DMSO (control negativo).
3. Después de 3 días, los números de células viables se cuantificaron usando un ensayo de proliferación dependiente de ATP.

El objetivo de la prueba era determinar la concentración a la que cada compuesto destruye 50% de las células cancerosas (IC₅₀) en vista de una aplicación potencial del compuesto en una prueba *in vivo* en animales.

Los datos procedentes del Experimento 1 se ajustaron a través de curvas sigmoideas de respuesta a la dosis y se analizaron usando el software de análisis estadístico Prism. Los datos procedentes del Experimento 2 se analizaron

usando un ajuste de la curva minimocuadrático de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism.

El valor de IC₅₀ encontrado para cada línea se presenta en la siguiente tabla, en comparación con los comparadores bien conocidos el esteroide antiandrogénico más potente, CPA, y enzalutamida, un potente antagonista oral de AR

Experimento 1

Los resultados se ajustaron a través de curvas sigmoideas de respuesta a la dosis en el software de análisis estadístico Prism.

Líneas de células tumorales	IC ₅₀ (microM) CB-03-06 [17 α -benzoato de cortexolona]	IC ₅₀ (microM) Acetato de ciproterona	IC ₅₀ (microM) Enzalutamida
Panc1	30	54	156
MiaPaca2	23	46	77

Experimento 2

Los resultados posteriores incluyen experimentos adicionales a los del Experimento 1. Los resultados se analizaron usando un ajuste de la curva minimocuadrático de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism.

Líneas de células tumorales	IC ₅₀ (microM) CB-03-06 [17 α -benzoato de cortexolona]	IC ₅₀ (microM) Acetato de ciproterona	IC ₅₀ (microM) Enzalutamida
Panc1	28	46	111
MiaPaca2	20	39	65

Los valores de IC₅₀ muestran que la actividad antitumoral de 17 α -benzoato de cortexolona es al menos dos veces superior que la actividad de los comparadores (CPA y enzalutamida). Puesto que MiaPaca2 se caracterizan por una expresión de AR baja/nula, la actividad anticancerosa del compuesto no se correlaciona directamente con la expresión de receptor androgénico en las líneas celulares cancerosas.

Ejemplo 4: actividad antitumoral *in vitro* de 17 α -valerato-21-propionato de cortexolona (CB-03-10) sobre líneas celulares de cáncer pancreático

El experimento se realizó para probar y para definir la actividad antitumoral *in vitro* de cortexolona (CB-03-10) sobre líneas celulares representativas de tumores pancreáticos, a saber Panc1 (AR⁺) y MiaPaca2 (AR bajo), representativas de líneas celulares de cáncer pancreático.

Las líneas también se clasificaron como positivas (AR⁺) o negativas/bajas (AR^{+/-}) a la presencia y la expresión del receptor androgénico.

El método experimental consistía en:

1. Se sembraron 3000 células cancerosas en placas de fondo plano de 96 pocillos en medio completo que contenía 2% de suero bovino tratado con carbón vegetal
2. Después de 24 horas, se añadió a los cultivos DHT (dihidrotestosterona) 10 nM con o sin compuestos antiandrogénicos, o vehículo de DMSO (control negativo).
3. Después de 3 días, los números de células viables se cuantificaron usando un ensayo de proliferación dependiente de ATP.

El objetivo de la prueba era determinar la concentración a la que cada compuesto destruye 50% de las células cancerosas (IC₅₀) en vista de una aplicación potencial del compuesto en una prueba *in vivo* en animales.

Los datos procedentes del Experimento 1 se ajustaron a través de curvas sigmoideas de respuesta a la dosis y se analizaron usando el software de análisis estadístico Prism. Los datos procedentes del Experimento 2 se analizaron usando un ajuste de la curva minimocuadrático de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism.

El valor de IC₅₀ encontrado para cada línea se presenta en la siguiente tabla, en comparación con comparadores bien conocidos: el esteroide antiandrogénico más potente, CPA, y enzalutamida, un antagonista oral de AR.

Experimento 1

Los resultados se ajustaron a través de curvas sigmoideas de respuesta a la dosis en el software de análisis estadístico Prism.

Líneas de células tumorales	IC ₅₀ (microM) CB-03-10 [17 α -valerato-21-propionato de cortexolona]	IC ₅₀ (microM) Acetato de ciproterona	IC ₅₀ (microM) Enzalutamida
Panc1	66	54	156
MiaPaca2	43	46	77

Experimento 2

- 5 Los resultados posteriores incluyen experimentos adicionales a los del Experimento 1. Los resultados se analizaron usando un ajuste de la curva minimocuadrático de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism.

Líneas de células tumorales	IC ₅₀ (microM) CB-03-10 [17 α -valerato-21-propionato de cortexolona]	IC ₅₀ (microM) Acetato de ciproterona	IC ₅₀ (microM) Enzalutamida
Panc1	60	46	111
MiaPaca2	37	39	65

- 10 Los valores de IC₅₀ muestran que la actividad antitumoral de 17 α -valerato-21-propionato de cortexolona (CB-03-10) no se correlacionan con la expresión del receptor androgénico sobre las líneas celulares de cáncer pancreático.

Ejemplo 5: Xenoinjerto de tumor pancreático humano *in vivo* en ratones

- 15 La actividad de 17 α -benzoato de cortexolona (CB-03-06) sobre el crecimiento de un tumor pancreático xenoinjertado en ratones lampiños macho se ha evaluado en comparación con el esteroide antiandrogénico más potente, acetato de ciproterona (CPA).

- 20 Se diluyeron separadamente 17 α -benzoato de cortexolona y acetato de ciproterona en DMSO/2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (vehículo).

- 25 La prueba se llevó a cabo comparando la actividad antitumoral de 17 α -benzoato de cortexolona en dos dosificaciones diferentes (8,0 mg/kg, correspondiendo aproximadamente a 230 μ M, y 40 mg/kg, correspondiendo aproximadamente a 1150 μ M), frente al vehículo (es decir 0,4% (v/v) de Tween 80 y 0,5% (p/v) de carboximetilcelulosa en solución salina normal) y frente al comparador acetato de ciproterona a dos dosificaciones diferentes (7,4 mg/kg y 37 mg/kg).

- 30 1x10⁶ células MiaPaca-2 suspendidas en Matrigel se inyectaron subcutáneamente en ratones lampiños atímicos de 6 semanas de edad.

- 35 El tratamiento con los compuestos probados, con el vehículo y con el compuesto comparativo se inició después de que el volumen tumoral hubiera alcanzado 50 mm³ después del trasplante. Todos los compuestos se inyectaron en 100 μ l/ratón subcutáneamente de solución de dosis baja (aproximadamente 230 μ M) o 100 μ l/ratón de solución de dosis alta (aproximadamente 1150 μ M) de 17 α -benzoato de cortexolona, vehículo y acetato de ciproterona, respectivamente. Los compuestos y los controles se administraron subcutáneamente diariamente durante 28 días.

Los tumores se midieron cada 4 días con un calibre digital.

- 40 Los resultados se representan en la Figura 1 como un cambio medio en el volumen del tumor con relación al inicio del tratamiento. El volumen del tumor se calculó según la fórmula $0,5236(r_1)^2(r_2)$ donde $r_1 < r_2$.

Las barras de error son la SEM para de 7 a 10 ratones por grupo de tratamiento. Los valores de P se calcularon según la prueba de la t de Student.

- 45 La dosis alta de 17 α -benzoato de cortexolona mantenía el incremento del tamaño del tumor pancreático de menos de 5 veces el tamaño del tumor cuando se iniciaba el tratamiento. En contraste, el tumor medio en el vehículo y en los grupos de tratamiento con acetato de ciproterona se incrementaba 12 veces en tamaño. A partir de estos datos, es evidente la actividad antitumoral del compuesto de la presente invención, 17 α -benzoato de cortexolona.

Ejemplo 6 - Xenoinjerto de tumor pancreático humano *in vivo* en ratones

- 50 La actividad de cortexolona (CB-03-10) en el modelo de xenoinjerto de tumor pancreático en ratones lampiños macho se ha evaluado en comparación con el esteroide antiandrogénico acetato de ciproterona (CPA).

- 55 Se diluyeron separadamente cortexolona (CB-03-10) y acetato de ciproterona en DMSO/2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (vehículo).

La prueba se llevó a cabo comparando la actividad antitumoral de 17 α -valerato-21-propionato de cortexolona (CB-03-10) a dos dosificaciones diferentes (aproximadamente 8,6 mg/kg y 43 mg/kg) frente al vehículo (es decir 0,4% (v/v) de Tween 80 y 0,5% (p/v) de carboximetilcelulosa en solución salina normal) y frente al comparador acetato de ciproterona en dos dosificaciones diferentes (7,4 mg/kg y 37 mg/kg).

1x10⁶ células MiaPaca-2 suspendidas en Matrigel se inyectaron subcutáneamente en ratones atímicos de 6 semanas de edad.

El tratamiento con el compuesto probado, con el vehículo y con el compuesto comparativo se inició después de que el tumor hubiera alcanzado un volumen de 50 mm³ después del implante, inyectando subcutáneamente 100 μ l/ratón de solución de dosis baja (aproximadamente 230 μ M) o 100 μ E/ratón de solución de dosis alta (aproximadamente 1150 μ M) de cortexolona (CB-03-10), vehículo y acetato de ciproterona, respectivamente. Los compuestos y los controles se administraron subcutáneamente diariamente durante 28 días.

Los tumores se midieron cada 4 días con un calibre digital.

Los resultados se representan en la Figura 2 como un cambio medio en el volumen del tumor con relación al inicio del tratamiento. El volumen del tumor se calculó según la fórmula $0,5236(r_1)^2(r_2)$ donde $r_1 < r_2$.

Las barras de error son la SEM para de 7 a 10 ratones por grupo de tratamiento. Los valores de P se calcularon según la prueba de la t de Student.

La dosis alta de cortexolona (CB-03-10) mantenía el incremento del tamaño del tumor pancreático hasta menos de 5 veces el tamaño del tumor inicial durante el tiempo de tratamiento. Por otra parte, cuando se detenía el tratamiento, el tamaño del tumor tendía a incrementarse de nuevo, pero con una velocidad y un grado inferiores. En contraste, el tumor medio en el vehículo y en los grupos de acetato de ciproterona se incrementaba en tamaño hasta 12 veces y más, llevando a la necesidad de suprimir algún animal de estos grupos por razones éticas. A partir de estos datos, es evidente la actividad antitumoral del compuesto de la presente invención, 17 α -valerato-21-propionato de cortexolona (CB-03-10).

A partir de los datos de los ejemplos 5 y 6, se confirmó la actividad antitumoral *in vivo* de 17 α -benzoato de cortexolona y cortexolona (CB-03-10) *in vivo* contra el tumor pancreático, y ambos compuestos tenían una actividad antitumoral superior que el acetato de ciproterona en el mismo modelo en animales (véase la Figura 3).

Ejemplo 7: Índice terapéutico *in vitro* sobre líneas celulares de cáncer pancreático

A fin de evaluar la seguridad de los compuestos que se iban a probar en los experimentos de viabilidad de las líneas celulares, se deben tener en cuenta todos los factores que tengan impacto sobre la supervivencia y la viabilidad celulares. En este sentido, es realmente importante la evaluación de la toxicidad intrínseca del compuesto y los comparadores. La relación a partir de la IC₅₀ de los compuestos sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y la IC₅₀ sobre las líneas celulares cancerosas constituyen el índice terapéutico y muestran que es el compuesto más seguro que se va a probar.

La IC₅₀ en PBMC se probó en 2 estados de activación diferentes:

estimulado - células que se dividen activamente
 reposo - células inactivas que no se dividen

Los resultados se presentan en las tablas posteriores, pertinentes para, respectivamente, PBMC estimuladas y PBMC en reposo:
 IC₅₀ (microM) sobre PBMC estimuladas

Experimento 1

Líneas celulares	IC ₅₀ de CB-03-06 [17 α -Benzoato de cortexolona] (microM)	IC ₅₀ de CB-03-10 [17 α -Valerato-21-propionato de cortexolona] (microM)	IC ₅₀ de acetato de ciproterona (microM)	IC ₅₀ de enzalutamida (microM)
Panc1	23	68	52	159
MiaPaca2	17	34	39	79
PBMC	113	106	63	52

Experimento 2

Líneas celulares	IC ₅₀ de CB-03-06 [17 α -Benzoato de cortexolona] (microM)	IC ₅₀ de CB-03-10 [17 α -Valerato-21-propionato de cortexolona] (microM)	IC ₅₀ de acetato de ciproterona (microM)	IC ₅₀ de enzalutamida (microM)
Panc1	28	60	46	110
MiaPaca2	20	37	39	65
PBMC	97	94	62	90

En paralelo, los mismos experimentos se han repetido sobre PBMC en reposo obteniendo los presentes resultados siguientes.

5 IC₅₀ (microM) sobre PBMC en reposo

Experimento 1

Líneas celulares	IC ₅₀ de CB-03-06 [17 α -Benzoato de cortexolona] (microM)	IC ₅₀ de CB-03-10 [cortexolona] (microM)	IC ₅₀ de acetato de ciproterona (microM)
Panc1	23	68	52
MiaPaca2	17	34	39
PBMC	100	114	18

10 Experimento 2

Líneas celulares	IC ₅₀ de CB-03-06 [17 α -Benzoato de cortexolona] (microM)	IC ₅₀ de CB-03-10 [17 α -Valerato-21-propionato de cortexolona] (microM)	IC ₅₀ de acetato de ciproterona (microM)
Panc1	28	60	46
MiaPaca2	20	37	39
PBMC	85	120	84

El índice terapéutico (TI) resultante calculado sobre PBMC estimuladas se presenta en las tablas posteriores:
TI en PBMC estimuladas

15

Experimento 1

Líneas celulares	TI de CB-03-06 [17 α -Benzoato de cortexolona]	TI de CB-03-10 [17 α -Valerato-21-propionato de cortexolona]	TI de acetato de ciproterona	TI de enzalutamida
Panc1	5	2	1	0
MiaPaca2	7	3	2	1

Experimento 2

20

Líneas celulares	TI de CB-03-06 [17 α -Benzoato de cortexolona]	TI de CB-03-10 [17 α -Valerato-21-propionato de cortexolona]	TI de acetato de ciproterona	TI de enzalutamida
Panc1	3	2	1	1
MiaPaca2	5	3	2	1

y el índice terapéutico resultante calculado sobre PBMC en reposo se presenta en las tablas posteriores:
TI en PBMC en reposo

25 Experimento 1

Líneas celulares	TI de CB-03-06 [17 α -Benzoato de cortexolona]	TI de CB-03-10 [17 α -Valerato-21-propionato de cortexolona]	TI de acetato de ciproterona
Panc1	4	2	0
MiaPaca2	6	3	0

Experimento 2

Líneas celulares	TI de CB-03-06 [17 α -Benzoato de cortexolona]	TI de CB-03-10 [17 α -Valerato-21-propionato de cortexolona]	TI de acetato de ciproterona
Panc1	3	2	4
MiaPaca2	4	3	1

30

En las tablas, el valor 0 indica una toxicidad superior en PBMC que en las líneas celulares cancerosas

Ejemplo 8: Actividad antitumoral *in vitro* de 17 α -benzoato de cortexolona y 17 α -valerato-21-propionato de cortexolona (CB-03-10) sobre líneas celulares de cáncer intestinal epitelial

El experimento se realizó para probar y definir la actividad anticancerosa *in vitro* de 17 α -benzoato de cortexolona y 17 α -valerato-21-propionato de cortexolona sobre líneas celulares representativas de tumores intestinales epiteliales, a saber HT29. El método experimental consistía en:

1. Células HT-29 en monocapa se sembraron en: placas de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 células/ml. Las células sembradas se mantuvieron a 37°C en CO₂ al 5% y se dejó que se unieran durante 24 h.
2. Posteriormente, las células se incubaron durante 72 h con los compuestos de prueba a cada una de las concentraciones de 0,16, 0,8, 4, 20, 100 y 500 mM.
3. Después de 72 h de tratamiento, se realizó el ensayo colorimétrico de MTT.

El objetivo de la prueba era determinar la concentración a la que cada compuesto destruye 50% de las células cancerosas (IC₅₀) en vista de una aplicación potencial del compuesto en una prueba en animales *in vivo*.

Los datos se analizaron usando un ajuste de la curva minimocuadrático de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism.

El valor de IC₅₀ encontrado para cada línea se presenta en la siguiente tabla.

Inhibición (%) a diferente concentración micromolar para los dos productos sobre HT29

Concentraciones micromolares	CB-03-10 [17 α -Valerato-21-propionato de cortexolona]	CB-03-06 [17 α -Benzoato de cortexolona]
0,8	0,44%	-1,55%
4	14,23%	20,40%
20	25,49%	53,60%
100	89,77%	92,24%
500	92,10%	92,31%

Los valores de IC₅₀ calculados para los dos productos (presentados aquí posteriormente) muestran que ambos compuestos muestran una actividad anticancerosa evidente sobre las HT29.

IC₅₀ calculada (concentración micromolar)

CB-03-06	15,97
CB-03-10	34,16

Ejemplo 9: Índice terapéutico *in vitro* sobre líneas celulares de cáncer intestinal epitelial

A fin de evaluar la seguridad de los compuestos que se iban a probar en los experimentos de viabilidad de las líneas celulares, se deben tener en cuenta todos los factores que tengan impacto sobre la supervivencia y la viabilidad celulares. En este sentido, es realmente importante la evaluación de la toxicidad intrínseca del compuesto y los comparadores. La relación entre la IC₅₀ de los compuestos sobre PBMC y la IC₅₀ sobre líneas celulares cancerosas constituye el índice terapéutico, un parámetro importante para definir la eficacia del producto en condiciones seguras.

La IC₅₀ en PBMC se probó en 2 estados de activación diferentes:

- Estimulado - células que se dividen activamente
- Reposo - células inactivas que no se dividen

El índice terapéutico (TI) resultante calculado sobre PBMC estimuladas y en reposo se presenta en las tablas posteriores:

Experimento 1

Producto	CB-03-06 (TI) [17 α -Benzoato de cortexolona]	CB-03-10 (TI) [17 α -Valerato-21-propionato de cortexolona]
Estimuladas	7	3
Reposo	6	3

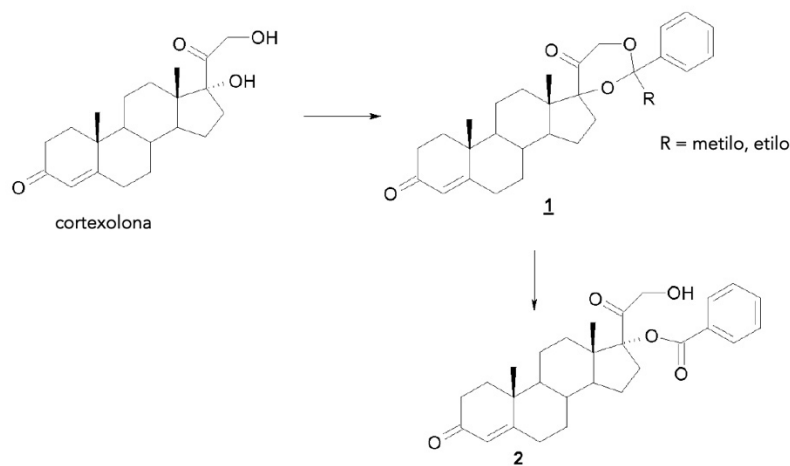
Experimento 2

Producto	CB-03-06 (TI) [17 α -Benzoato de cortexolona]	CB-03-10 (TI) [17 α -Valerato-21-propionato de cortexolona]
Estimuladas	6	3
Reposo	5	4

A partir de estos datos, se confirmó la actividad antitumoral y la seguridad del compuesto de la presente invención, 17 α -valerato-21-propionato de cortexolona, frente a las células cancerosas intestinales epiteliales.

Ejemplo 10 - Síntesis de 17 α -benzoato de cortexolona

Se preparó 17 α -benzoato de cortexolona según un esquema de síntesis que incluye las siguientes etapas:



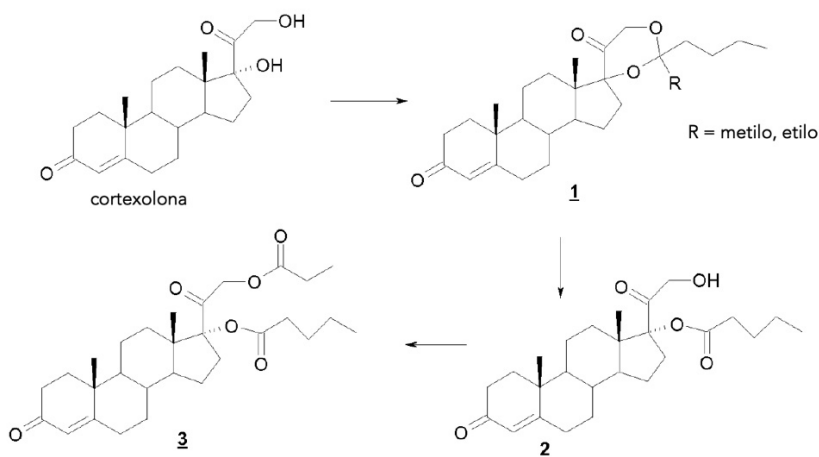
En la Etapa 1, se disolvió corticosterona en un disolvente adecuado (p. ej. acetato de etilo). Se añadió tosilato de piridinio o ácido *p*-toluenosulfónico en cantidad catalítica (1-10% en moles) seguido por ortobenzoato de trialquilo (R = metilo o R= etilo). La mezcla de reacción se calentó hasta 80°C durante de 3 a 6 horas.

Después de la retirada del disolvente y la cristalización en un disolvente alcohólico, se obtuvo ortobenzoato de corticosterona **1** como un sólido.

En la Etapa 2, se disolvió ortobenzoato de corticosterona **1** (R= metilo o R= etilo) en un disolvente alcohólico (p. ej. metanol) y se trató con tampón acético 0,1 N a reflujo. Después de la retirada del disolvente, el residuo se purificó mediante tratamiento con agua desmineralizada y se recuperó 17- α -benzoato de corticosterona como un sólido.

Ejemplo 11 - Síntesis de corticosterona (CB-03-10) (3) y 17 α -valerato de corticosterona (CB-03-05) (2)

Se preparó 17 α -valerato-21-propionato de corticosterona (CB-03-10) según el siguiente esquema sintético:



Etapa 1: Se disolvió cortexolona en un disolvente adecuado (p. ej. acetato de etilo). Se añadió tosilato de piridinio o ácido *p*-toluenosulfónico en cantidad catalítica (1-10% en moles), seguido por ortovalerato de trialquilo (R= metilo o R= etilo). La mezcla de reacción se calentó hasta 80°C durante 3-5 horas y, después de la retirada del disolvente y la cristalización en un disolvente alcohólico, se obtuvo ortovalerato de cortexolona **1**.

En la Etapa 2, se disolvió ortovalerato de cortexolona **1** (R= metilo o R= etilo) en un disolvente alcohólico (p. ej. metanol) y se trató con tampón acético 0,1 N (pH de 3 a 3,9) a reflujo. Después de la retirada del disolvente seguida por tratamiento con agua purificada, se recuperó 17 α -valerato de cortexolona **2** como un sólido.

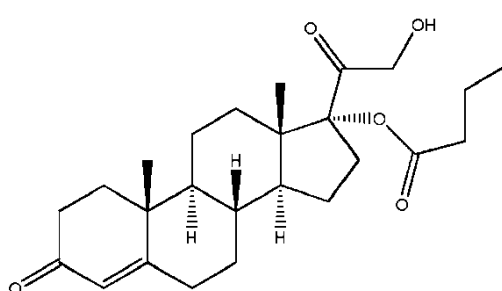
En la Etapa 3, se disolvió 17 α -valerato de cortexolona **2** en piridina y se añadió con 1 equivalente de cloruro de propionilo. Cuando la conversión era completa, la mezcla se diluyó con agua, y el producto **3** se recuperó como un sólido y se purificó mediante cristalización con alcoholes.

Ejemplo 12 - Análisis de la actividad anticancerosa *in vitro* del compuesto derivado de cortexolona CB-03-10

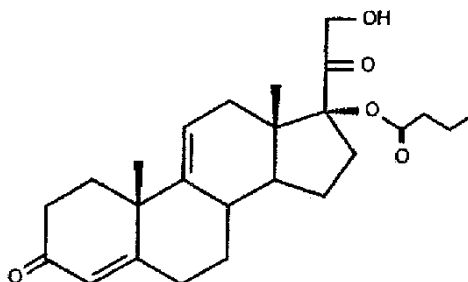
Se probó la capacidad de CB-03-10 para inhibir el crecimiento de líneas celulares cancerosas establecidas *in vitro*.

Las líneas celulares cancerosas se sembraron en 3000 células en placas de fondo plano de 96 pocillos en medio completo que contenía 2% de suero bovino tratado con carbón vegetal. Después de 24 horas, se añadieron los compuestos de prueba o DMSO/vehículo (concentración final 0,1% como control negativo). CPA y enzalutamida, dos potentes antiandrógenos reconocidos, se usaron como control positivo para la citotoxicidad celular. Después de 3 días, los números de células viables se cuantificaron usando un ensayo de viabilidad celular dependiente de ATP (Promega Cell Titer Glo). En la Figura 5, se muestra una valoración de la dosis de la actividad citotóxica de compuestos derivados de cortexolona sobre líneas celulares humanas y pancreáticas.

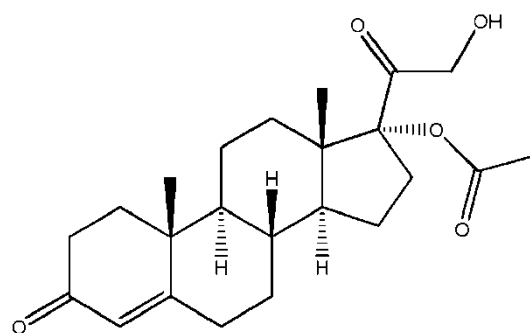
Se realizó la determinación de la concentración a la que cada compuesto destruye 50% de las células cancerosas (IC₅₀) para expresar la capacidad de CB-03-10 y otros compuestos para inhibir el crecimiento de células cancerosas. Cada uno de los compuestos se valoró de 3 uM a 200 uM. Después de 3 días, los números de células viables se cuantificaron usando un ensayo de proliferación dependiente de ATP. Los datos mostrados en la Tabla I se analizaron usando un ajuste de la curva minimocuadrático de regresión no lineal en el software estadístico Prism.



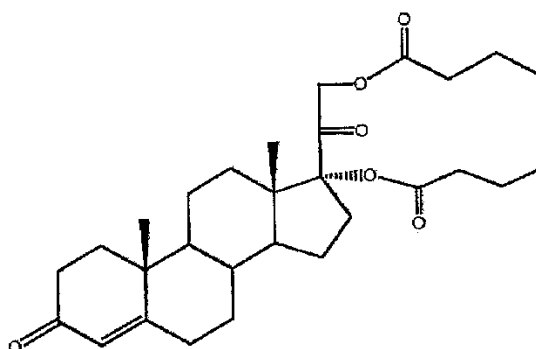
CB-03-05



CB-03-04



CB-03-01



CB-03-03

Está claro a partir de los datos mostrados en la Figura 5 y la Tabla I que los compuestos derivados de cortexolona destruyen células cancerosas a diversas concentraciones e IC_{50} . CB-03-10 destruye células de cáncer de próstata (grupo a) mejor que el potente antiandrógeno CPA. De forma más importante, CB-03-10 inhibía el crecimiento *in vitro* de células de cáncer de próstata mejor que la enzalutamida, un fármaco antiandrógeno nuevo y potente usado actualmente en el entorno clínico como una primera elección para cánceres de próstata dependientes de andrógenos.

De forma interesante, CB-03-10 inhibe el crecimiento de líneas celulares pancreáticas de crecimiento rápido (grupo b) que se sabe que expresan receptor androgénico (AR) a niveles muy bajos. Estos datos sugieren un mecanismo de acción independiente relacionado con la citotoxicidad y a continuación la actividad antiandrógena.

Ejemplo 13 - Análisis de la expresión de receptor androgénico sobre líneas celulares cancerosas probadas

Se realizó un ensayo de FACS sobre líneas celulares prostáticas y pancreáticas probadas en la Tabla I para entender mejor la relación entre la expresión de AR en líneas celulares cancerosas y la capacidad de CB-03-10 para inhibir el crecimiento de células cancerosas.

La Figura 6 muestra el nivel de expresión de AR sobre las células cancerosas probadas. Según se espera, la expresión de AR por análisis de FACS en líneas celulares prostáticas y pancreáticas está de acuerdo con los niveles de expresión publicados: LNCaP > Panc1 > PC3 = MiaPaca2.

Para clarificar mejor la correlación entre AR y IC_{50} , la Tabla I se aplicó añadiendo la expresión de AR de las líneas celulares cancerosas probadas (Tabla II).

Nombre de la línea celular	CB-03-01 C17 prop	CB-03-03 C17,21 but	CB-03-049 deshi 17 but	CB-03-05 C17 val	CB-03-06 C17 ben	CB-03-10 C17,21 val	Enzalutamida	CPA	Expresión de AR
LNCaP	33	16	46	32	12	10	38	22	9
PC3	190	53	140	170	28	53	180	90	1
Panc1	490	70	340	74	28	60	110	46	4
MiaPaca2	110	30	160	59	20	37	65	39	1

Tabla II. Expresión de AR de líneas celulares de cáncer prostático y pancreático e IC₅₀ de compuestos derivados de cortexolona

Según se esperaba, la inhibición del crecimiento mostrada por los potentes antiandrógenos CPA y enzalutamida se correlaciona con la expresión de AR en células de cáncer de próstata. Las actividades inhibitoras de CB-03-10 también se correlacionan (menos estrictamente) con la expresión de AR en células de cáncer de próstata. Sin embargo, hay una correlación inversa entre la expresión de AR y las actividades inhibitoras en las células de cáncer pancreático. Todos los compuestos probados eran más activos en las MiaPaca2 de menor expresión de AR (AR+/-) en comparación con las células Panc1 (AR +). Este resultado apunta a un posible mecanismo de acción independiente de AR en el cáncer pancreático. CB-03-10 es uno de los compuestos más potentes de la serie. Notablemente, CB-03-10 es más potente que la enzalutamida en líneas celulares de cáncer de próstata.

Ejemplo 14 - Análisis de la actividad anticancerosa *in vitro* de compuestos derivados de cortexolona, en particular CB-03-10, sobre una muestra mayor de líneas celulares cancerosas derivadas de tumores sólidos

Puesto que la actividad citotóxica de CB-03-10 no parece correlacionarse con la expresión de AR, se probó una muestra mayor de tumores sólidos. MCF7, una línea celular de cáncer de mama (AR^{+/+}), una línea de células pancreáticas adicional con mayor expresión de AR (BxPC3) y una línea celular de cáncer intestinal (HT29) (AR⁻) se añadieron al grupo previo. Los resultados se representan en la Tabla III.

Proliferación <i>in vitro</i> IC ₅₀ (μM)					Genotipo	
Tipo de tejido	Nombre de la línea celular	CB-03-05 C17 val	CB-03-10 C17,21 val	Enzalutamida	Expresión de proteína de AR con relación a PC3	Expresión de proteína de GR con relación a LNCaP
Cáncer de próstata	LNCaP	32	10	38	9	1
	PC3	170	53	180	1	2
	22Rv1		18		positiva basándose en la bibliografía	negativa basándose en la bibliografía
Cáncer pancreático	Panc1	74	60	110	4	positiva basándose en la bibliografía
	MiaPaca2	59	37	65	1	4
	BxPC3		30	127	3	positiva basándose en la bibliografía
Cáncer de mama	MCF7	50	28	129	1	2
	MDA-MB-231	inactivo	106	200	1	5
Cáncer de colon	HT29	530	14	150	1	2
Linfocito sano	PBMC REPOSO	120	120		nd	positiva basándose en la bibliografía
	PBMC ESTIMULADAS	130	94	90	nd	positiva basándose en la bibliografía

Tabla III. IC₅₀ de CB-03-10 en líneas celulares de cáncer caracterizadas por la expresión de AR y GR

CB-03-10 inhibe fuertemente la viabilidad celular de múltiples líneas celulares cancerosas de diferente origen epitelial. La actividad citotóxica de los compuestos no se correlaciona con la expresión de AR. Adicionalmente, CB-03-10 es más potente que la enzalutamida en todas las líneas celulares cancerosas probadas.

Ejemplo 15 - Índice terapéutico de compuestos derivados de cortexolona sobre diferentes líneas celulares cancerosas

El índice terapéutico (TI) (también denominado intervalo terapéutico o intervalo de seguridad o a veces relación terapéutica) es una comparación de la cantidad de un agente terapéutico que provoca el efecto terapéutico con la cantidad que provoca toxicidad. La IC₅₀ de los compuestos se determinó sobre células recientes aisladas de sangre humana (PBMC). La toxicidad de los compuestos se determinó como sigue:

Índice terapéutico = Seguridad/Potencia = IC₅₀ PBMC estimuladas / IC₅₀ células cancerosas

Los resultados se muestran en la Tabla IV

5

Proliferación in vitro IC ₅₀ (μM)									
Tipo de tejido	Nombre de la línea celular	CB-03-01 C17 prop	CB-03-03 C17,21 but	CB-03-04 9deshi 17 but	CB-03-05 C17 val	CB-03-06 C17 ben	CB-03-10 C17,21 val	Enzalutamida	CPA
Cáncer de próstata	LNCaP	33	16	46	32	12	10	38	22
	PC3	190	53	140	170	28	53	180	90
Cáncer pancreático	Panc1	490	70	340	74	28	60	110	46
	MiaPaca2	110	30	160	59	20	37	65	39
	BxPC3					28	30	127	
Cáncer de mama	MCF7	121	32	88	50	25	28	129	64
Cáncer de colon	HT29			51	30	10	14	150	
Linfocito sano	PBMC ESTIMULADAS	0,1	140	360	130	97	94	90	62
Índice terapéutico = IC ₅₀ PBMC en reposo / IC ₅₀ células cancerosas									
Tipo de tejido	Nombre de la línea celular	CB-03-01 C17 prop	CB-03-03 C17,21 but	CB-03-04 9deshi 17 but	CB-03-05 C17 val	CB-03-06 C17 ben	CB-03-10 C17,21 val	Enzalutamida	CPA
Cáncer de próstata	LNCaP	0	9	8	4	8	9	2	3
	PC3	0	3	3	1	3	2	1	1
Cáncer pancreático	Panc1	0	2	1	2	3	2	1	1
	MiaPaca2	0	5	2	2	5	3	1	2
	BxPC3					3	3	1	
Cáncer de mama	MCF7	0	4	4	3	4	3	1	1
Cáncer de colon	HT29			7	4	6	3		
Linfocito sano	PBMC ESTIMULADAS	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla IV. Índice terapéutico de compuestos derivados de cortexolona sobre un grupo de líneas celulares cancerosas.

- 10 Todos los compuestos derivados de cortexolona muestran un robusto perfil de seguridad. CB-03-10 muestra un alto índice terapéutico. Esto revela que CB-03-10 tiene un perfil más seguro en comparación con CPA y enzalutamida.

Ejemplo 16 - Afinidad de unión de CB-03-10 para el receptor androgénico

- 15 Los experimentos previos demostraron una fuerte actividad citotóxica de CB-03-10 sobre líneas celulares cancerosas derivadas de tumores de diferentes orígenes. Esta actividad citotóxica no se correlacionaba completamente con la expresión contra el receptor androgénico sobre las células cancerosas probadas. Basándose en esta evidencia, se diseñaron ensayos para probar la afinidad del compuesto para el AR. Para determinar las
- 20 afinidades de unión relativas de CB-03-10 al AR silvestre, se usó un ensayo competitivo usando el estuche Polar Screen de life Technologies. Brevemente, el AR se añadió a un ligando androgénico fluorescente (Fluormone™ AL Green) para formar el complejo AR-LBD. Los competidores desplazaban el ligando Fluormone™ AL Green fluorescente del AR-LBD haciendo que el ligando fluorescente caiga rápidamente durante su tiempo de fluorescencia, dando como resultado un bajo valor de polarización. Los no competidores no desplazarán el ligando fluorescente del complejo, de modo que el valor de polarización permanezca alto. El desplazamiento en el valor de polarización en presencia de compuestos de prueba se usa para determinar la afinidad relativa de los compuestos de prueba para AR-LBD. La afinidad de CB03-10 para el receptor AR era 1,1E-06 (IC₅₀ molar); en el mismo ensayo,
- 25 la afinidad de la dihidrotestosterona (un potente ligante del receptor AR) era 1,1E-08. La afinidad de unión de CB-03-10 para el receptor AR cuando se comparaba con DHT es baja y caracteriza a CB-03-10 como un ligante potencial de AR

Ejemplo 17 - Actividad de transcripción de CB-03-10 sobre el receptor glucocorticoideo

Las hormonas androgénicas y glucocorticoides provocan efectos divergentes y a menudo opuestos en células, tejidos y animales. Una amplia gama de evidencia fisiológica y de biología molecular sugiere que los receptores que median en estos efectos, los receptores de andrógeno y glucocorticoide (AR y GR, respectivamente), influyen en la actividad de transcripción mutua. Las actividades antagonista y agonista de GR CB-03-10 se probaron en un ensayo *in vitro*. Brevemente, células epiteliales de riñón humano se transfectaron con una construcción de ADN que contenía sitios de unión a GR conectados a una molécula indicadora de base luminiscente. Después de 24 horas, las células se trataron bajo modos antagonista o agonista. Después de 24 horas adicionales, se cuantificó la luminiscencia que es proporcional a la actividad de transcripción de agonistas de GR.

El ensayo antagonista se basaba en la inhibición de la luminiscencia inducida por dexametasona (Dex).

La actividad antagonista de CB-03-10 se comparó con un antagonista de GR conocido, mifepristona (también llamada RU486) mostrado en la Figura 7.

Ensayo agonista - se basaba en la inducción de luminiscencia por CB-03-10 La actividad agonista de CB-03-10 se comparó con una RU486 que se sabe que no tiene actividad agonista según se muestra en la Figura 8.

Según se muestra en la Figura 7, CB-03-10 es un potente antagonista (10 veces menos que RU486). En contraste, CB-03-10 es esencialmente ineficaz como agonista de GR ya que se requieren concentraciones muy altas para inducir una actividad que sea 20% de la de Dex. 50 nM.

Ejemplo 18 - Inducción por CB-03-10 de la apoptosis y la interrupción del ciclo celular

Se ha mostrado que la mayoría de los fármacos anticancerosos citotóxicos usados actualmente inducen apoptosis en células sensibles. El hecho de que agentes dispares, que interactúan con diferentes dianas, induzcan la muerte celular con algunas características comunes sugiere que la citotoxicidad está determinada por la capacidad de la célula para participar en esta llamada muerte celular 'programada'. CB-03-10 se evaluó para determinar si el mecanismo de la citotoxicidad sobre líneas celulares cancerosas estaba mediado por apoptosis e interrupción del ciclo celular. Las líneas celulares cancerosas se sembraron en placas de fondo plano de 6 pocillos. Después de 24 horas, se añadieron compuestos de prueba o vehículo de DMSO (control negativo). Después de 24 horas adicionales, las células se rasparon y se tiñeron con anexina V y yoduro de propidio conjugados a fluoresceína y se analizaron mediante citometría de flujo.

La Figura 9 muestra claramente cómo CB-03-10 es capaz de inducir apoptosis en líneas celulares de cáncer pancreático. CB-03-10 induce apoptosis en un total de 28% de células (apoptosis temprana y tardía) frente a solamente 11% por el control.

La apoptosis se puede producir en la transición G1/S o G2/M del ciclo celular. Las células se trataron con CB-03-10 durante 24 horas y a continuación se fijaron con paraformaldehído y se tiñeron con yoduro de propidio. Los datos de la Figura 10 indican que CB-03-10 induce un bloqueo de la fase S a concentraciones inferiores y a continuación un bloqueo de G2/M a una concentración superior. La falta de bloqueo de G1 indica ausencia de efecto sobre p53. Los bloqueos de S y G2/M pueden indicar actividad sobre moléculas de comprobación del ciclo celular. Para la fase S, una posible diana es la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2). Gemzar y cisplatino son fármacos ejemplares que actúan en la fase S. Para G2, una posible diana es CDK1.

Ejemplo 19 - Análisis de la inducción de caspasas por CB-03-10

A partir de estudios previos, se determinó que CB-03-10 induce apoptosis usando tinción con anexina V en células MiaPaca2. Para analizar mejor el fenómeno, se midieron la actividad enzimática de caspasa 8 (caspasa iniciadora para la ruta extrínseca) y caspasa 9 (caspasa iniciadora para la ruta intrínseca) y de las caspasas 3 y 7 (caspasas efectoras).

Con este propósito, se sembraron células MiaPaca2 en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos. Después de 24 horas, los compuestos de prueba se añadieron a células, se usaron gemcitabina (un agente quimioterapéutico conocido para el cáncer pancreático) y DMSO como control positivo y negativo, respectivamente. Después de una incubación de 8, 24 y 48 horas con compuestos de prueba, las células se sometieron a lisis en tampón que contenía el sustrato de caspasa 3/7 u 8 o 9 y una luciferasa estable en tampones patentados. Los lisados se transfirieron a placas blancas opacas antes de medir la luminiscencia en un instrumento Tecan Safire. Se usaron placas paralelas tratadas idénticamente para determinar células viables. Todas las actividades de caspasa se corrigieron para el número de células viables. Los resultados se muestran en la Figura 11.

Las actividades de las caspasas 8 y 9 (grupos A y B) se indujeron mediante CB-03-10. Esta inducción era rápida, estaba relacionada con la dosis y era ya evidente después de 8 horas y era tan alta como 7 veces de incremento en

comparación con el control.

La gemcitabina (un agente quimioterapéutico conocido usado para el tratamiento del cáncer pancreático) también inducía las actividades de caspasa 8 y 9 pero con una respuesta retardada y menos potente en comparación con CB-03-10. El incremento de 2, 3 veces en la actividad de caspasa 8 y 9 no se observa hasta la marca de 48 horas.

Las caspasas 3/7 (grupo C) se indujeron mediante CB-03-10 también en este caso ya a las 8 horas y a un nivel realmente alto después de 48 horas de incubación. De forma interesante, CB-03-05 no muestra un buen perfil para la activación de caspasas. El incremento de gemcitabina en la actividad de caspasa 3/7 no se observa hasta la marca de 48 horas.

Se repitió el mismo ensayo usando líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP (Figura 12). En este caso, el control positivo es enzalutamida, un antiandrógeno potente y nuevo usado en el entorno clínico para tratar a pacientes con cáncer de próstata. Los resultados se muestran en la Figura 12 a las 24 horas de incubación cuando las actividades de caspasa alcanzaban un máximo.

El experimento muestra claramente que CB-03-10 inducía las actividades de caspasas iniciadoras (8 y 9) y efectoras (3/7) mejor que la enzalutamida (usada como control positivo). Estos resultados mostraban una fuerte inducción por CB-03-10 de la actividad de caspasas en líneas celulares de cáncer de próstata, que afectan a las rutas tanto intrínsecas como extrínsecas, confirmando la inhibición observada sobre líneas celulares MiaPaca2.

Ejemplo 20 - Metabolismo *in vitro* de CB-03-10 en plasma de rata y ser humano

Para obtener algunas ideas sobre el metabolismo de CB-03-10 en plasma de ser humano y de rata, se diseñó un ensayo específico. Brevemente, el compuesto se incubó en un momento diferente en plasma de ser humano y rata a 37°C. Después de la incubación, las muestras se probaron con respecto a la presencia del compuesto intacto mediante cromatografía de líquidos. El transcurso del tiempo y la concentración se muestran en la Figura 13.

Los resultados muestran que CB-03-10 es degradado rápidamente hasta CB-03-05 en plasma humano y es degradado más rápidamente en plasma de rata en comparación con el humano.

Ejemplo 21 - Análisis de la farmacocinética *in vivo* de CB-03-10 en un modelo en animal (ratón)

La farmacocinética de CB-03-10 se evaluó en plasma de ratones después de la administración intravenosa (IV), subcutánea (SC) y oral (PO).

A los ratones (3 por grupo) se les administraron las siguientes dosis, la sangre se recogió en los momentos indicados. Las muestras de plasma se analizaron mediante HPLC-MS/MS.

Grupo	Vía de dosificación	Punto temporal del recogida de muestra
1	iv (20 mg/kg)	10 min, 1 h, 4 h
		30 min, 2 h, 8 h
2	SC (40 mg/kg)	30 min, 2 h, 8 h
		1 h, 4 h, 24 h
3	PO (40 mg/kg)	30 min, 2 h, 8 h
		1 h, 4 h, 24 h

CB-03-10 era indetectable en plasma incluso después de 1 hora independientemente de la vía de administración. Sin embargo, CB-03-10 se metabolizaba hasta CB-03-05 con una exposición corporal de 189 (SC) y 47 (PO) horas/ng/ml (figura 14).

Ejemplo 22 - Prueba *in vivo* de CB-03-10 en un modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer pancreático humano (línea celular MiaPaca2)

A partir de estudios previos, se observó que CB-03-10 inhibe fuertemente el crecimiento *in vitro* de líneas celulares pancreáticas MiaPaca2 (AR^{+/+}). Se realizó una investigación de si este resultado se podía traducir en un modelo de cáncer pancreático xenoinjertado *in vivo*. Se usó como control CPA, un antiandrógeno muy conocido. Brevemente, 1x10⁶ células MiaPaca2 suspendidas en Matrigel se inyectaron subcutáneamente (SC) en ratones lampiños atímicos de 6 semanas de edad. Los tumores se midieron cada 4 días con un calibre digital. El volumen del tumor se calculó según la fórmula: 0,5236(r1) 2(r2) donde r1 < r2. El tratamiento con CB-03-10 y compuestos de control se inició después de que el tumor hubiera alcanzado 50 mm³. Compuestos diluidos en DMSO/2-hidroxipropil-b-ciclodextrina (vehículo) se inyectaron subcutáneamente (SC) diariamente (100 µl/ratón) a la concentración de 40 mg/kg al día durante 28 días consecutivos. La Figura 15 muestra el incremento del tumor medio en el modelo de xenoinjerto *in vivo* después de una inyección SC de CB-03-10 cuando se compara con el vehículo.

En la Figura 15, CB-03-10 muestra una actividad contra tumores pancreáticos *in vivo* fuerte y significativa cuando se

compara con los controles. También muestra una actividad antitumoral significativa ($p < 0,5$) cuando se compara con vehículo solo o CPA (no mostrado).

Durante el período de tratamiento, CB-03-10 mantenía el incremento de tamaño del tumor pancreático hasta menos de 5 veces con relación al tamaño inicial. En contraste, el tumor medio en los grupos de tratamiento con vehículo o CPA se incrementaba en tamaño hasta 12 veces. CB-03-10, además de inhibir el crecimiento del tumor, también mostraba un beneficio en la supervivencia de los ratones. De forma importante, 14 días después de que se detuviera el tratamiento, los ratones tratados con CB-03-10 todavía mantenían tumores significativamente menores en comparación con el grupo con vehículo solamente (6-veces frente a 14 veces, respectivamente)

La supervivencia mediana era 70 días para ratones tratados con CB-03-10 en comparación con 60 días para ratones tratados con vehículo o 40 días con CPA. Esta diferencia es significativa con un riesgo de muerte de 2 a 4 veces superior en el grupo tratado con vehículo.

Ejemplo 23 - Prueba *in vivo* de CB-03-10 administrado oralmente en un modelo de cáncer de próstata humano xenoinjertado en ratones (células LNCaP)

A partir de los estudios previos, se observó que CB-03-10 también era eficaz para inhibir *in vitro* el crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP. Se realizó una investigación sobre si este resultado se podía traducir en un modelo de cáncer de próstata xenoinjertado *in vivo*. 3×10^6 células LNCaP suspendidas en Matrigel se inyectaron subcutáneamente (en el costado derecho) en ratones lampiños atímicos de 6 semanas de edad. Los tumores se midieron según se describe anteriormente. El tratamiento con CB-03-10 y compuestos de control se inició después de que el tumor hubiera alcanzado 50 mm³. Las formulaciones para dosificación se prepararon en 15% de vitamina E-TPGS y 65% de una solución de CMC al 0,5% p/v en tampón de citrato 20 mM (pH 4). La dosificación oral era diaria (100 mg/kg en 200 μ l/ratón) durante 28 días consecutivos. Los resultados se representaron como cambio medio en el volumen del tumor con relación al inicio del tratamiento. La Figura 16 muestra los resultados obtenidos a partir del modelo de cáncer de próstata xenoinjertado *in vivo* después de la administración oral de CB-03-10. Se usó como control enzalutamida, un antiandrógeno nuevo y potente.

El CB-03-10 administrado oral mostraba una mejor actividad antitumoral que la enzalutamida durante el período de tratamiento de 28 días. El volumen del tumor se incrementaba hasta solo 2 veces con CB-03-10 y 3 veces con enzalutamida en comparación con 10 veces en el grupo de control negativo.

CB-03-10 también es más eficaz que la enzalutamida para mantener un pequeño incremento de tamaño del tumor de próstata después de que se detuviera el tratamiento (cambio de 5 frente a 8 veces). Incluso 6 semanas después de que se detuviera el tratamiento, el volumen medio del tumor en el grupo de CB-03-10 era 3,6 veces menor que en el grupo de vehículo.

Ejemplo 24 - Inhibición con CB-03-10 de la secreción de antígeno específico de la próstata (PSA) *in vitro* desde células de cáncer de próstata LNCaP

El antígeno específico de la próstata, o PSA, es una proteína producida por células de la glándula prostática. La prueba de PSA mide el nivel del PSA en la sangre del hombre. El nivel en sangre de PSA a menudo es elevado en hombres con cáncer de próstata y se usa como un marcador sustitutivo para probar la progresión del cáncer de próstata en la población humana. Después de la observación de que CB-03-10 era capaz de inhibir *in vivo* el crecimiento del cáncer de próstata, se determinó la capacidad del compuesto para inhibir la secreción de PSA *in vitro* desde células cancerosas. Células LNCaP se sembraron en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos en medio que contenía suero tratado con carbón vegetal con o sin DHT 10 nM. Después de 24 horas, los compuestos de prueba se añaden a las células, usando DMSO como el control negativo de vehículo y enzalutamida como el control positivo. Después de 48 horas de incubación con compuestos de prueba, los sobrenadantes se recogieron y se probaron con un ensayo Elisa con respecto al PSA y las mismas células se sometieron a lisis para la evaluación de la viabilidad celular.

Según se esperaba, el antiandrógeno enzalutamida puro es potente para inhibir la secreción de PSA con una $IC_{50} < 3 \mu M$; CB-03-10 también es un potente inhibidor de PSA (IC_{50} 9 μM). Sin embargo, la actividad de enzalutamida no se valoraba tan bien como CB-03-10. Cabe destacar que la cortexolona, el metabolito original y final de todos los compuestos probados, es esencialmente inactiva sobre la secreción de PSA (IC_{50} de 612 μM). Cuando se probaba la viabilidad celular de estas células, la enzalutamida mostraba una IC_{50} de 61 μM y CB-03-10 mostraba una IC_{50} de 11 μM . Esto confirma la fuerte actividad inhibidora del crecimiento de ambos compuestos. De forma importante e interesante, la cortexolona, el metabolismo original y final de todos los compuestos probados, inhibía la viabilidad de LNCaP solo a una concentración muy baja (IC_{50} de 153 μM) y es esencialmente inactiva como compuesto citotóxico para líneas celulares cancerosas.

Ejemplo 25 - Análisis de la actividad anticancerosa *in vitro* de CB-03-10 sobre líneas celulares de cáncer de mama

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) supone alrededor de 20% del cáncer de mama invasivo actualmente diagnosticado. Este subtipo de cáncer no está apoyado por las hormonas estrógeno y progesterona, ni por la presencia de demasiados receptores HER2, por esta razón los pacientes no responden a la terapia convencional (p. ej. tamoxifeno o herceptina). Por consiguiente, este cáncer se caracteriza por resistencia a la quimioterapia y baja supervivencia en los pacientes.

Existe una correlación entre esta resistencia del cáncer y una alta expresión de GR (Cancer therapy 2013). Hay estudios clínicos que prueban un antagonista de GR (mifepristona/RU486) en combinación con quimioterapia para el tratamiento de TNBC. Sin embargo, el uso clínico de mifepristona está comprometido debido a la polifarmacología ligada al antagonismo del receptor de progesterona (PR). Para evaluar si CB-03-10 se puede usar como tratamiento potencial para el cáncer de mama, y en particular TNBC, se realizó un ensayo citotóxico usando líneas celulares de cáncer de mama caracterizadas por la expresión de diversos receptores hormonales

Las líneas celulares de cáncer de mama seleccionadas para este ensayo eran:

Células de cáncer de mama MCF7 (ER⁺PR⁺Her2⁺, GR^{+/-})
Células TBNC MDA-MB-231 (ER⁻PR⁻Her2⁻, GR⁺⁺)

Antes de probar la inhibición del crecimiento celular, las células de cáncer de mama se caracterizaron con respecto a la expresión de los receptores AR y GR mediante FACS según se describe previamente. Los datos mostrados en la Figura 18 confirman la expresión de receptor según se indica en la bibliografía.

Para el ensayo citotóxico: células sembradas en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos en medio que contenía suero tratado con carbón vegetal. Después de 24 horas, se añadieron a las células compuestos de prueba. Se usó DMSO como el control negativo de vehículo y RU486 como el control positivo. Después de 72 horas de incubación, las células se recogieron, se sometieron a lisis y la viabilidad se determinó usando el ensayo Cell Titer Glow para la viabilidad.

La Tabla VI muestra la IC₅₀ de CB-03-10 sobre las susodichas líneas celulares de cáncer de mama

	MCF7 (ER ⁺ PR ⁺ GR ^{+/-})	MDA-MB-231 (ER ⁻ PR ⁻ GR ⁺⁺)
RU486	No activa	435
CB-03-10	28	106
CB-03-05	50	No activa

CB-03-10 es activo sobre ambas líneas de cáncer de mama, pero parece más activo en células MCF7 que MDA-MB-231, apuntando quizás a que GR no es la única diana para este compuesto. RU486, mifepristona, (antagonista de GR/PR) no afecta, según lo esperado, a la viabilidad de células GR^{+/-} MCF7, mientras que inhibe, en un grado muy bajo, la viabilidad de células TNBC GR⁺⁺MDA-MB-231 hasta un máximo de 25% a 100 μ M. De forma interesante, CB-03-05 solo es activo en MCF7, no en MDA-MB-231. No está claro qué receptor es responsable de este efecto diferencial debido a que estas células son diferentes para al menos 4 receptores. Si no es GR, entonces podrían ser ER (receptor estrogénico) (ER), PR (receptor de progesterona) o Her2 los que se expresen en MCF7 pero no MDA-MB-231.

CONCLUSIÓN GENERAL

Estos ejemplos demuestran que el 17 α -valerato-21-propionato de cortexolona (CB-03-10), en particular, tiene una actividad superior más allá de otros compuestos derivados de cortexolona conocidos. Se han observado resultados incrementados tanto *in vitro* como *in vivo* en cuanto a, por ejemplo:

- I) actividad antitumoral *in vitro* general;
- II) actividad antitumoral *in vitro* no correlacionada directamente con la expresión de AR;
- III) actividad antitumoral *in vitro* correlacionada directamente con la expresión de GR;
- IV) índice terapéutico (TI); y
- V) actividad antitumoral *in vivo* contra tumores pancreáticos y prostáticos;
- VI) Está claro a partir de los datos mostrados en la Tabla I posterior que los compuestos derivados de cortexolona destruyen células cancerosas en diferentes concentraciones e IC₅₀. Sin embargo, CB-03-06 y CB-03-10 muestran la mejor IC₅₀ cuando se comparan con los otros compuestos en la serie derivada de cortexolona a través de las líneas celulares cancerosas de diferente origen. Incluso el metabolito CB-03-05 de CB-03-10 muestra buen valor de IC₅₀ en células de cáncer de próstata LNCaP (IC₅₀ 32 μ M). La IC₅₀ inferior indica una actividad antitumoral *in vitro* más fuerte.

Nombre de la línea	CB-03-01 C17 prop	CB-03-03 C17,21 but	CB-03-04 9deshi 17 but	CB-03-05 C17 val	CB-03-06 C17 ben	CB-03-10 C17,21 val	Enzalutamida	CPA
--------------------	----------------------	---------------------------	------------------------------	---------------------	---------------------	---------------------------	--------------	-----

celular								
LNCaP	33	16	46	32	12	10	38	22
PC3	190	53	140	170	28	53	180	90
Panc1	490	70	340	74	28	60	110	46
MiaPaca2	110	30	160	59	20	37	65	39

Tabla I. IC₅₀ de compuestos derivados de cortexolona probados en líneas celulares de cáncer prostático y pancreático

II) La expresión de AR se probó en las líneas celulares cancerosas, véase la Tabla II

En líneas celulares de cáncer de próstata, según se esperaba, la inhibición del crecimiento mostrada por potentes antiandrógenos como CPA y enzalutamida se correlaciona con la expresión de Ar en células de cáncer de próstata (cuanto mayor sea la expresión de AR, mejor es la actividad citotóxica, expresada como IC₅₀ inferior). Además, CB-03-04 muestra una IC₅₀ de 46 cuando se prueba sobre LNCaP (línea celular de cáncer de próstata que expresa un alto nivel de receptor androgénico) pero una IC₅₀ muy superior (135) cuando se prueba sobre PC3 que expresa poco o nada de AR. Notablemente, la actividad citotóxica de CB-03-06 y CB-03-10 no está evidentemente influenciada por la expresión de receptor androgénico en células de cáncer de próstata. CB-03-06 y CB-03-10 se caracterizan por una IC₅₀ muy buena casi independiente de la expresión de AR.

En líneas celulares pancreáticas, donde la expresión de AR era baja o casi nula, CB-03-06 y CB-03-10 muestran una potente actividad citotóxica, superior que CPA y enzalutamida. La actividad superior se puede deber a un mecanismo de acción adicional relacionado con la unión a receptores adicionales.

Nombre de la línea celular	CB-03-01 C17 prop	CB-03-03 C17,21 but	CB-03-049 deshi 17 but	CB-03-05 C17 val	CB-03-06 C17 ben	CB-03-10 C17,21 val	Enzalutamida	CPA	Expresión de AR
LNCaP	33	16	46	32	12	10	38	22	9
PC3	190	53	140	170	28	53	180	90	1
Panc1	490	70	340	74	28	60	110	46	4
MiaPaca2	110	30	160	59	20	37	65	39	1

Tabla II. Expresión de AR de líneas celulares de cáncer prostático y pancreático e IC₅₀ de compuestos derivados de cortexolona

III) El índice terapéutico (TI) (también denominado intervalo terapéutico o intervalo de seguridad o relación terapéutica) es una comparación de la cantidad de un agente terapéutico que provoca el efecto terapéutico a la cantidad que provoca toxicidad. La IC₅₀ de los compuestos se determinó sobre células recientes aisladas de sangre humana (PBMC). La toxicidad del compuesto se determinó como sigue:

Índice terapéutico = Seguridad/Potencia = IC₅₀ PBMC estimuladas / IC₅₀ células cancerosas Los resultados se muestran en la Tabla VII. Todos los compuestos derivados de cortexolona muestran un perfil de toxicidad robusto y seguro. Sin embargo, CB-03-06 y CB-03-10 mostraban el índice terapéutico más alto cuando se probaban a través de las 7 líneas celulares cancerosas probadas *in vitro*.

Índice terapéutico = IC50 PBMC en reposo / IC50 células cancerosas									
Tipo de tejido	Nombre de la línea celular	CB-03-01 C17 prop	CB-03-03 C17,21 but	CB-03-04 9deshi 17 but	CB-03-05 C17 val	CB-03-06 C17 ben	CB-03-10 C17,21 val	Enzalutamida	CPA
Cáncer de próstata	LNCaP	0	9	8	4	8	9	2	3
	PC3	0	3	3	1	3	2	1	1
Cáncer pancreático	Panc1	0	2	1	2	3	2	1	1
	MiaPaca2	0	5	2	2	5	3	1	2
	BxPC3					3	3	1	
Cáncer de mama	MCF7	0	4	4	3	4	3	1	1
Cáncer de colon	HT29			7	4	6	3		
MEDIA		0	4	4	3	5	4	1	1

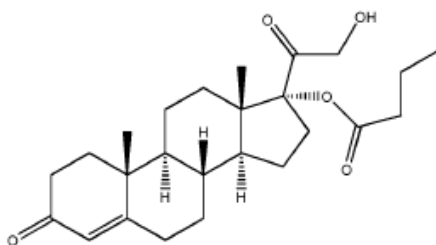
Tabla VII. Índice terapéutico de compuestos derivados de cortexolona en un grupo de líneas celulares cancerosas

IV) Cáncer de mama triple negativo (TNBC) según se muestra en el ejemplo 25. La actividad citotóxica mostrada por CB-03-10 es particularmente impresionante debido a que habitualmente los agentes terapéuticos convencionales no funcionan sobre líneas de cáncer de mama triple negativo (TNBC). TNBC se define como la ausencia de expresión

de receptores de estrógeno y progesterona así como amplificación de ERBB2. No es sensible a terapias endocrinas o anti-ERBB2. Estudios recientes han encontrado algunas dianas terapéuticas potenciales para TNBC. Sin embargo, todavía tiene escasos resultados. Teniendo en cuenta la actividad citotóxica y el excelente perfil de seguridad de CB-03-10; CB-03-10 es un candidato nuevo y mejorado para el tratamiento clínico de este cáncer.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:

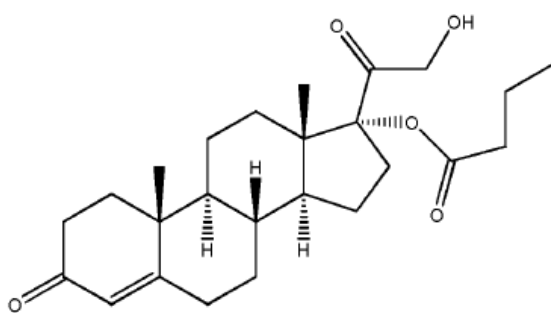


17α-valerato de cortexolona

para su uso en el tratamiento de carcinoma de próstata; carcinoma mamario; carcinoma pancreático; carcinoma pulmonar; carcinoma del tracto gastrointestinal; cáncer de riñón; carcinoma tiroideo; carcinoma uterino o carcinoma adrenal; y en donde el carcinoma de próstata es resistente a terapia dirigida anti andrógenos.

2. El compuesto para el uso según la reivindicación 1 en donde la terapia dirigida antiandrógeno es enzalutamida.

3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula:



17α-valerato de cortexolona

para su uso en el tratamiento de carcinoma de próstata; carcinoma mamario; carcinoma pancreático; carcinoma pulmonar; carcinoma del tracto gastrointestinal; cáncer de riñón; carcinoma tiroideo; carcinoma uterino o carcinoma adrenal; y en donde el carcinoma de próstata es resistente a terapia dirigida anti andrógenos.

4. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 3 en donde la terapia dirigida antiandrógeno es enzalutamida.

5. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 3 o 4 y al menos otro ingrediente activo, preferiblemente un ingrediente activo quimioterapéutico.

6. La composición farmacéutica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, para el uso con una segunda composición que comprende al menos otro ingrediente activo, preferiblemente un ingrediente activo quimioterapéutico, para la administración simultánea, separada o secuencial.

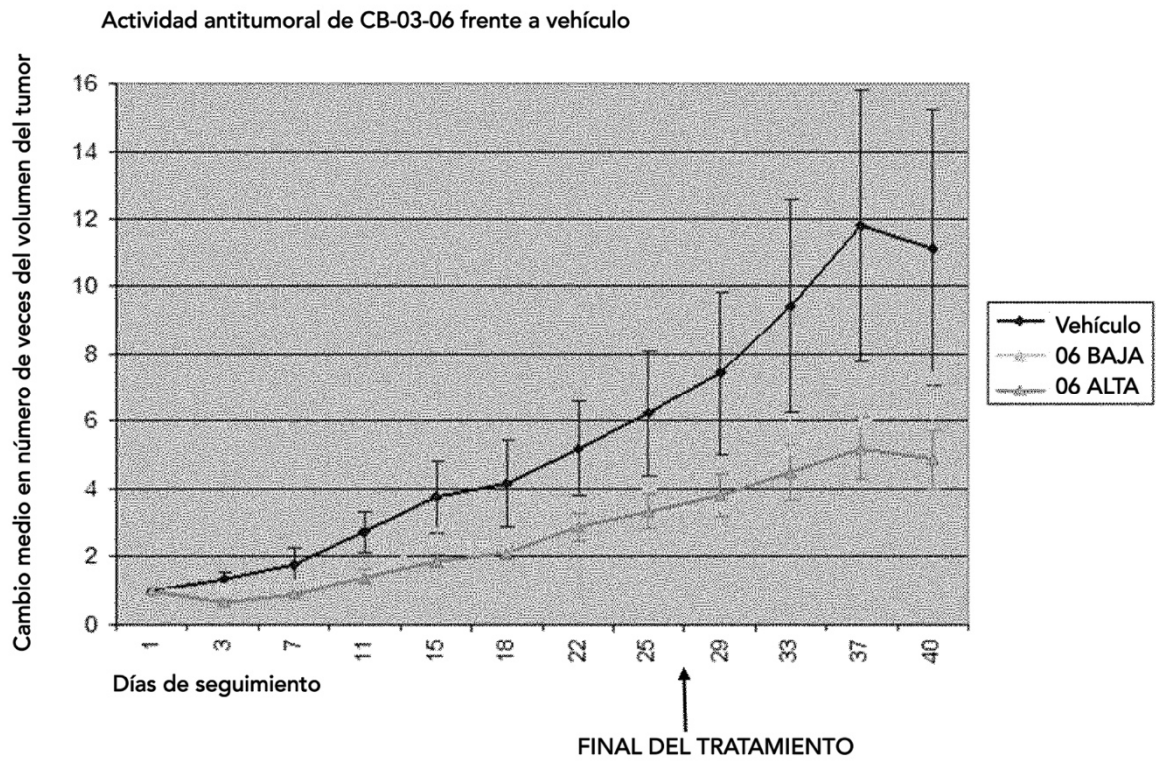


Figura 1

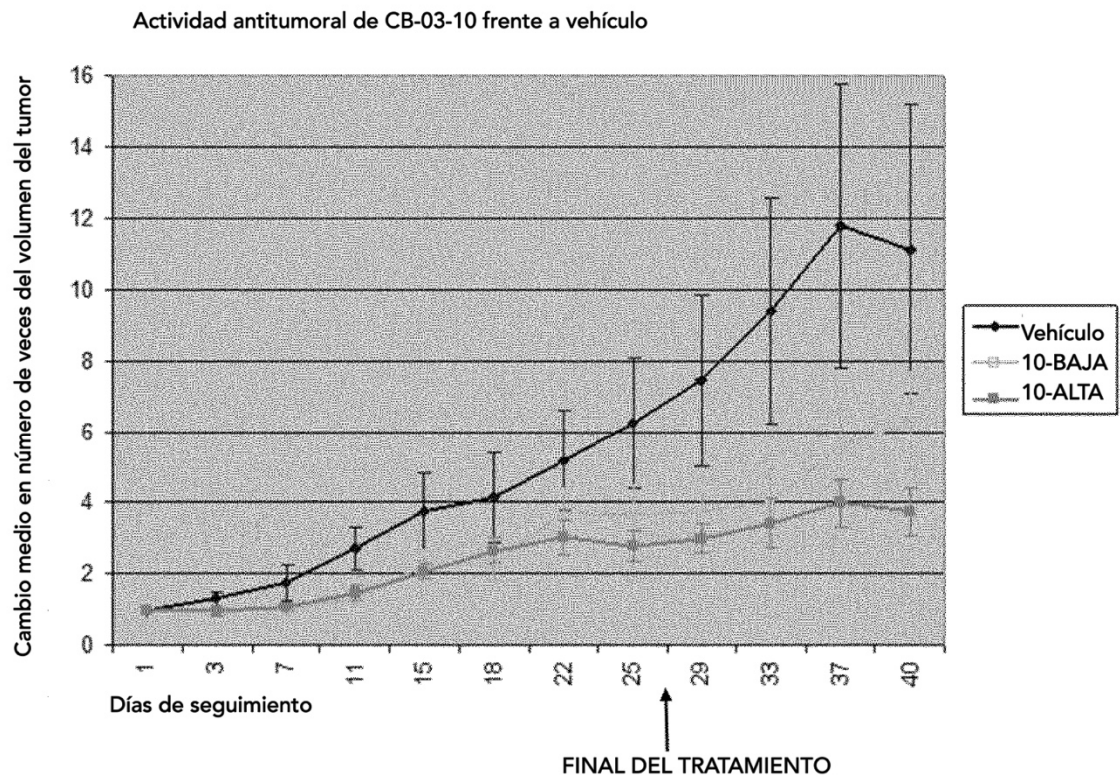


Figura 2

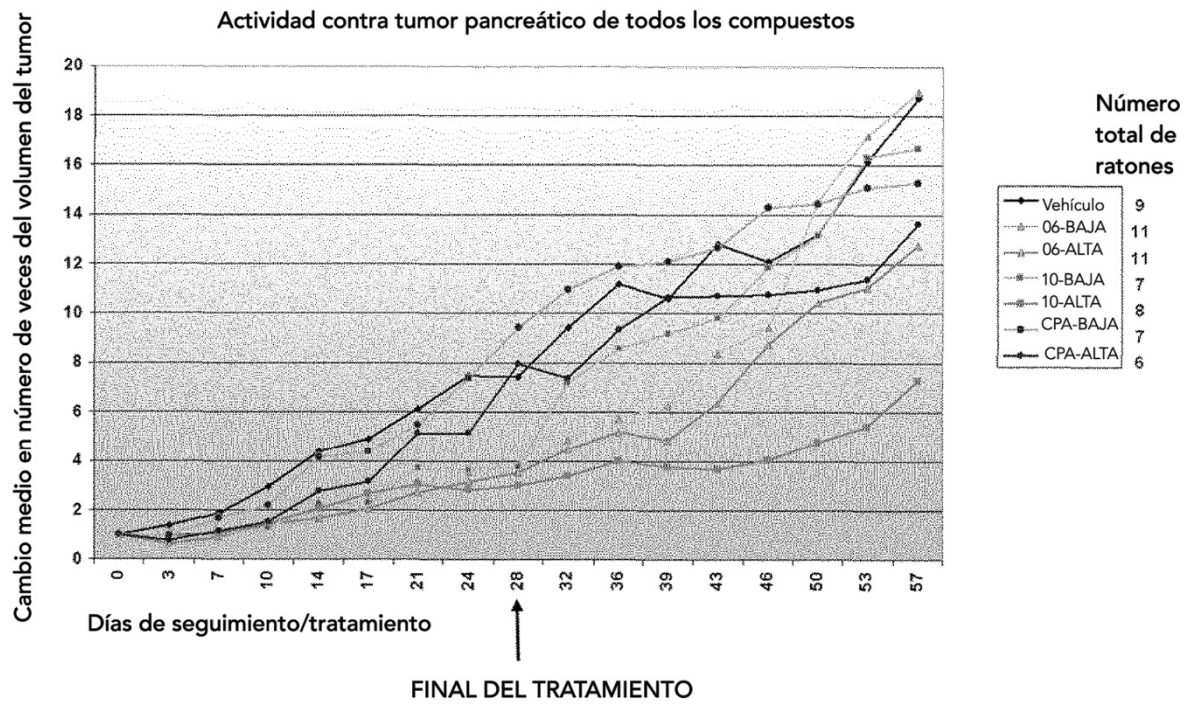


Figura 3

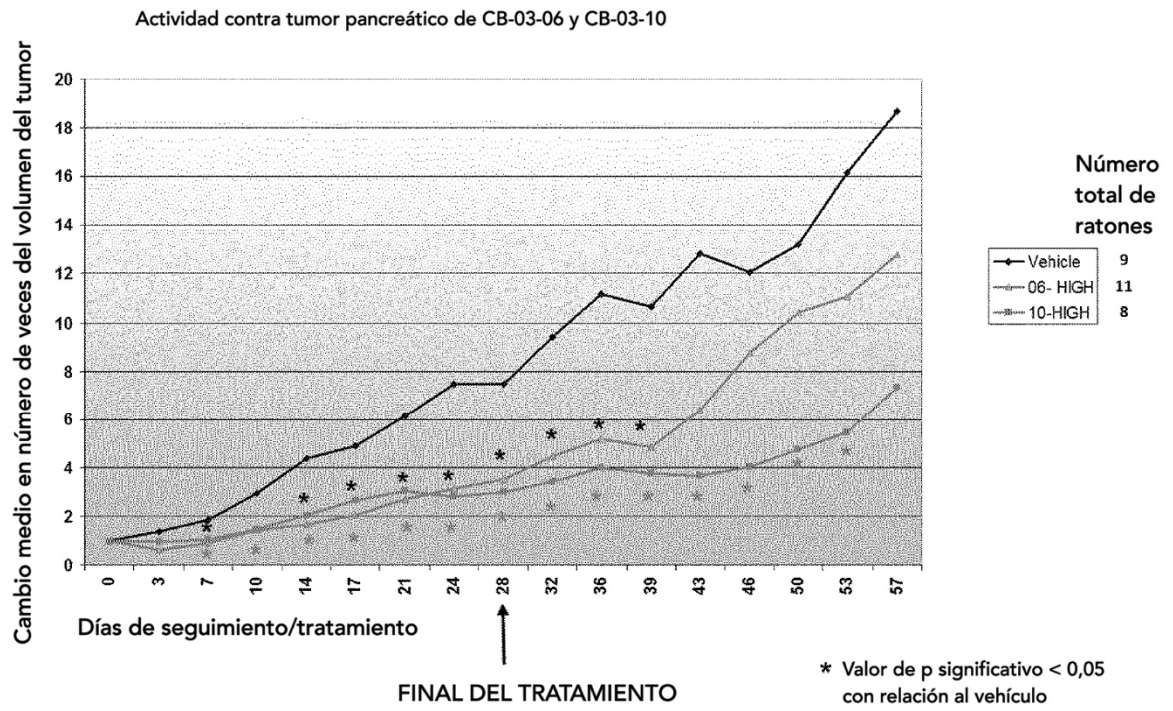
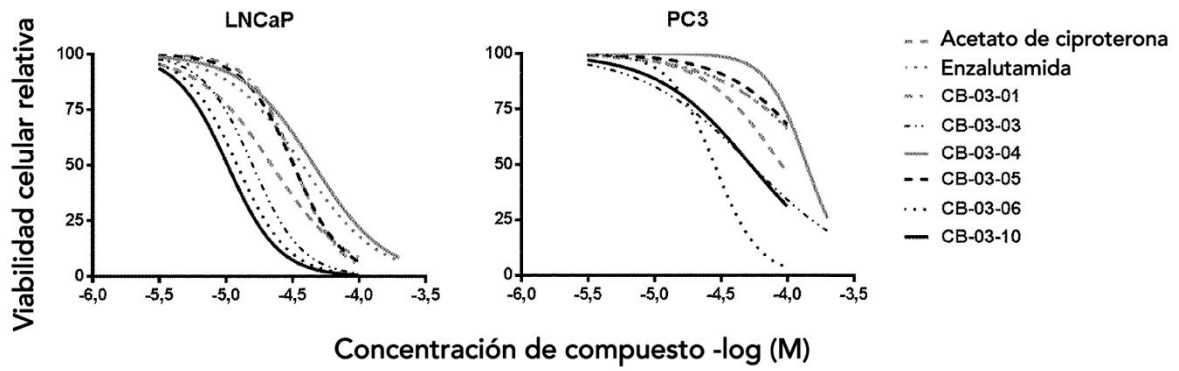


Figura 4

(a) Viabilidad celular de cáncer de próstata



(b) Viabilidad celular de cáncer pancreático

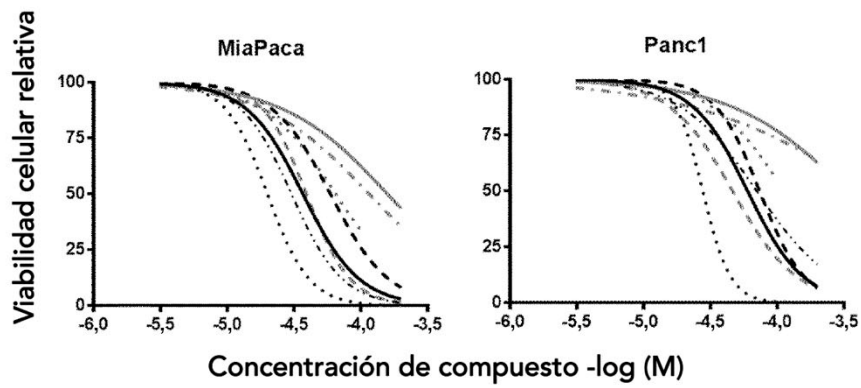
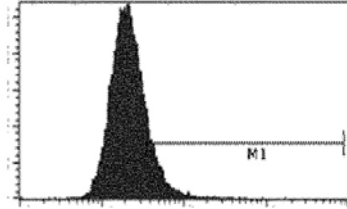
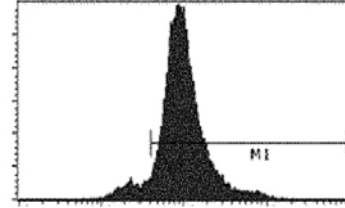


Figura 5

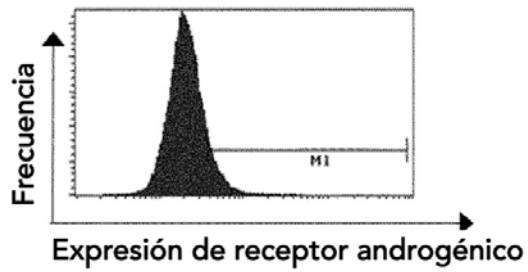
(a) PC-3 Próstata



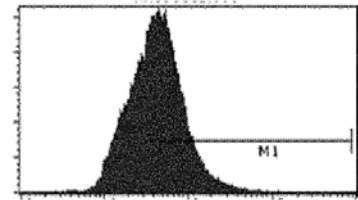
(b) LNCaP Próstata



(c) MiaPaca-2 Pancreático



(d) Panc-1 Pancreático



Línea celular cancerosa	Expresión relativa de AR
PC-3	1
MiaPaca-2	1
Panc-1	2
LNCaP	5

Figura 6

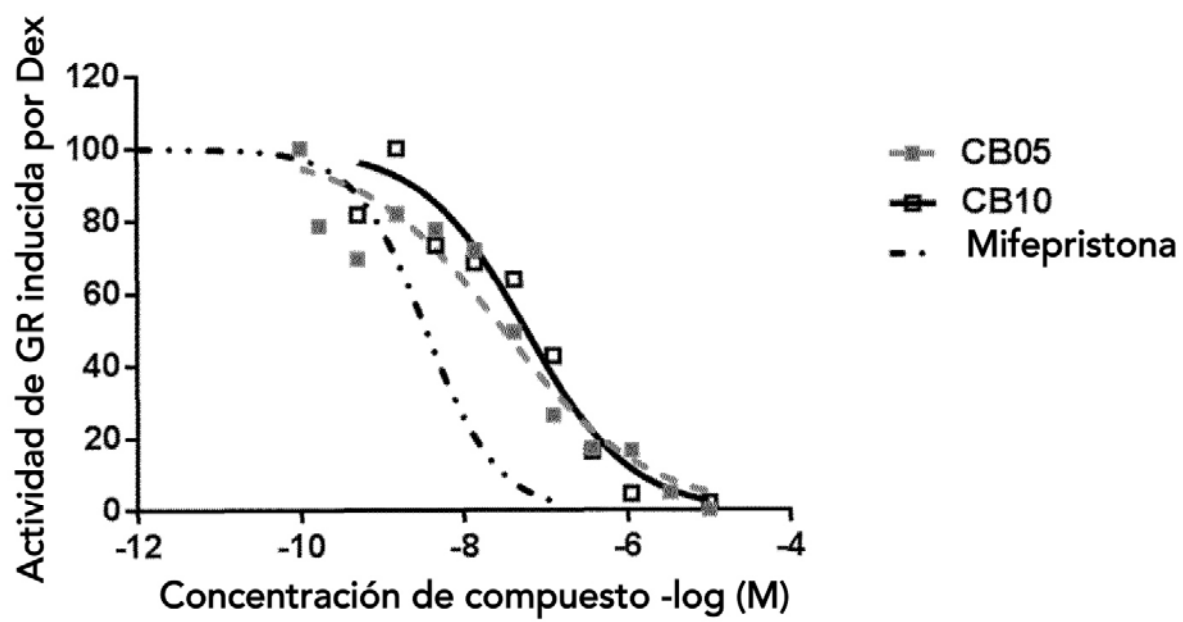


Figura 7

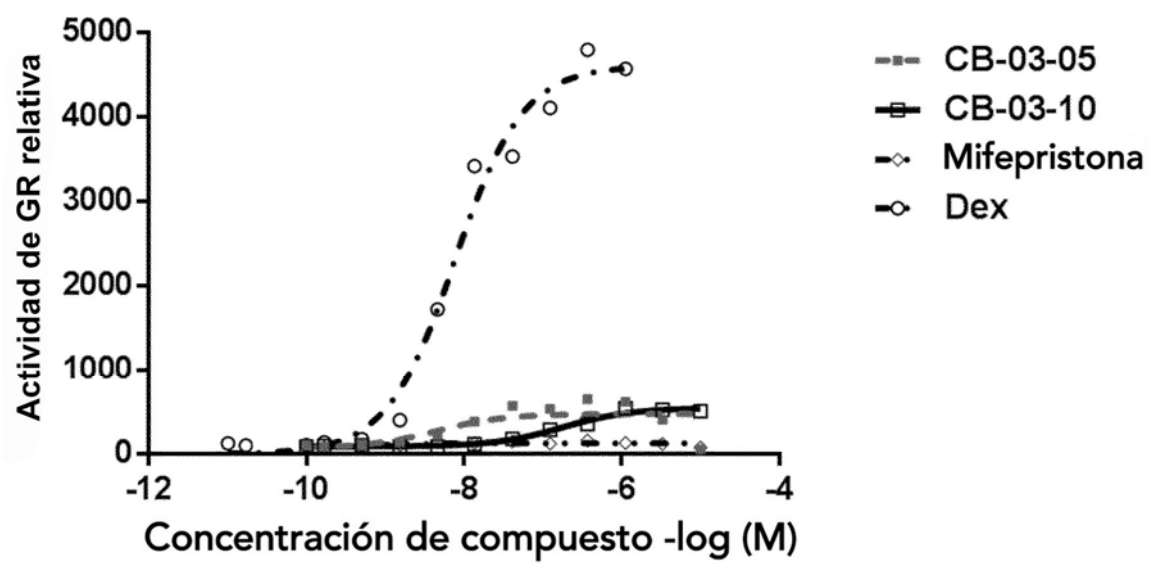
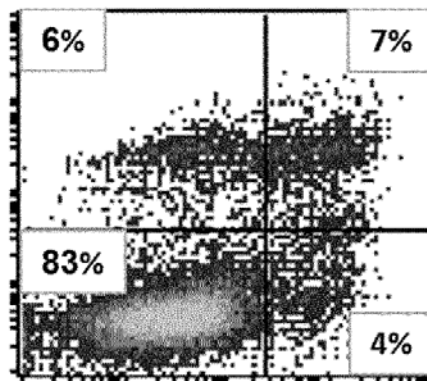
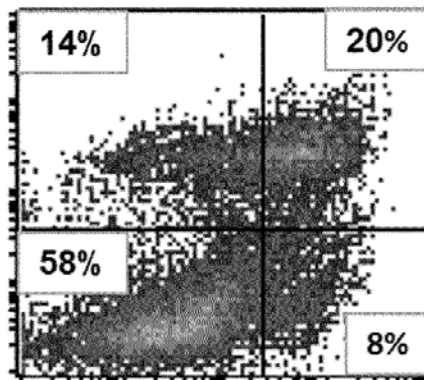


Figura 8



Control



CB-03-10

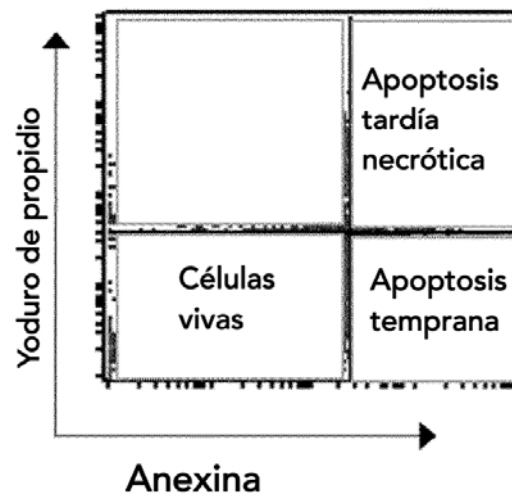


Figura 9

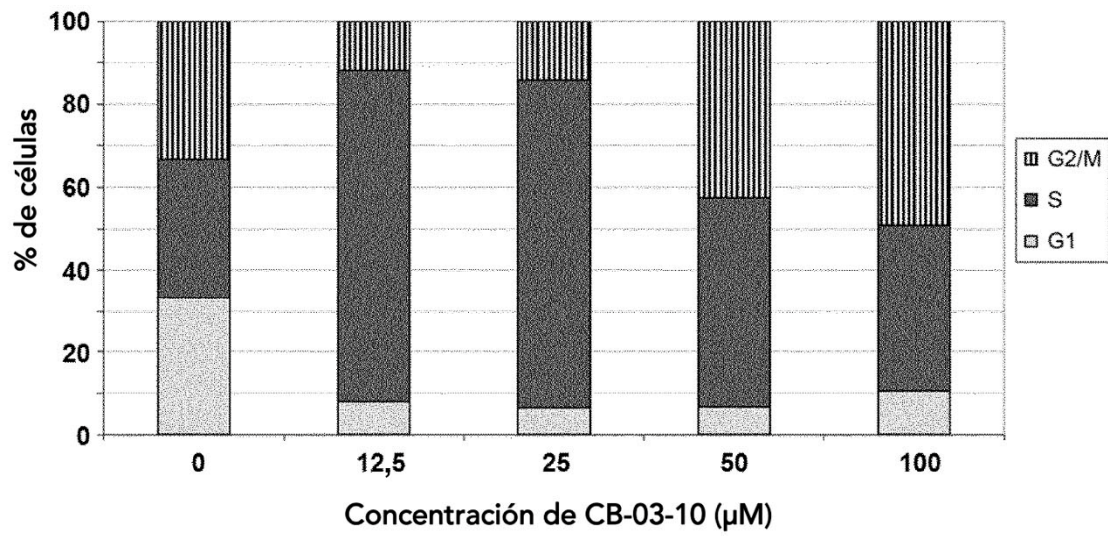


Figura 10

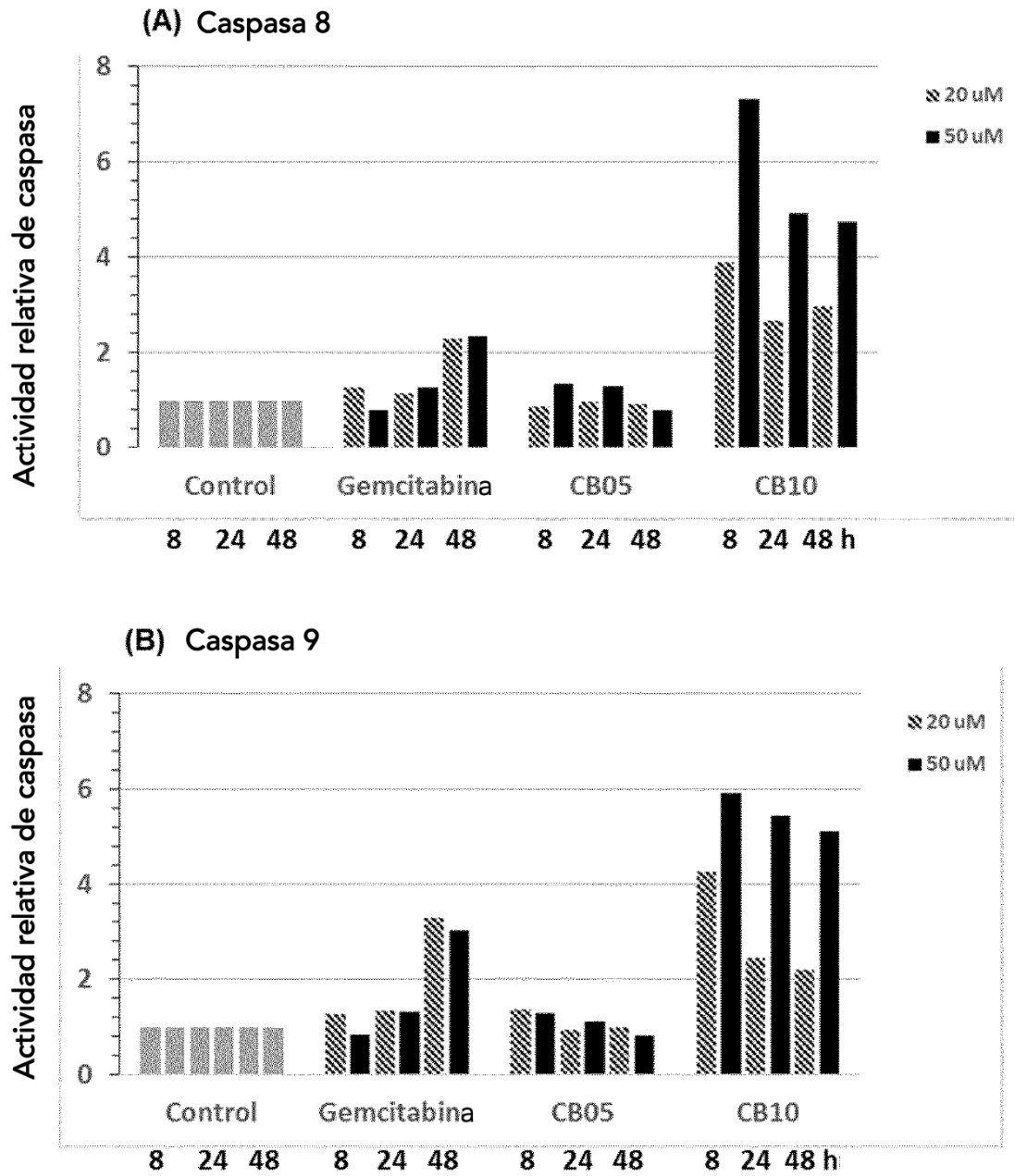


Figura 11

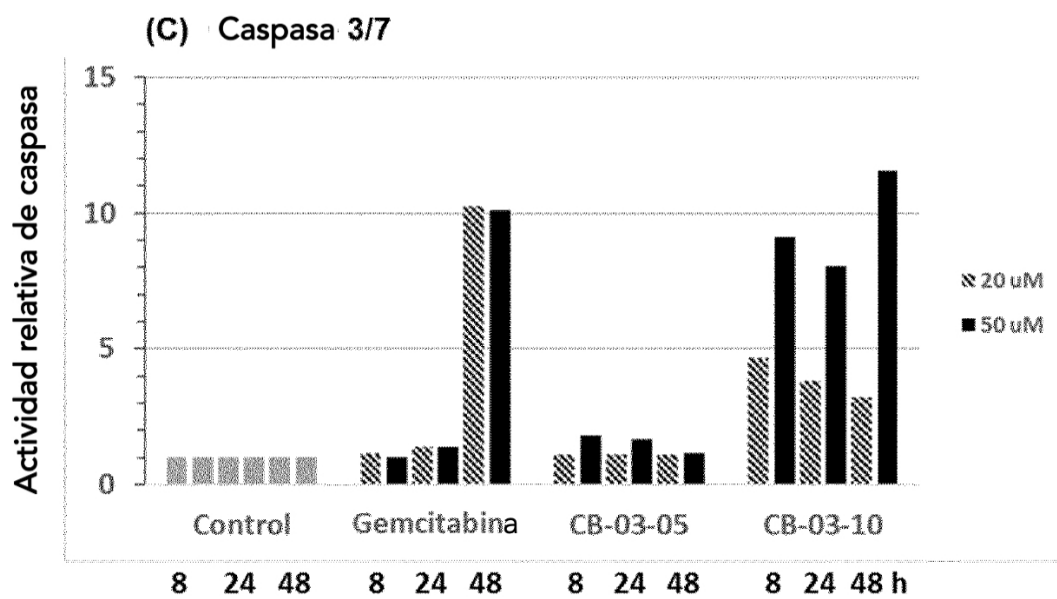


Figura 11

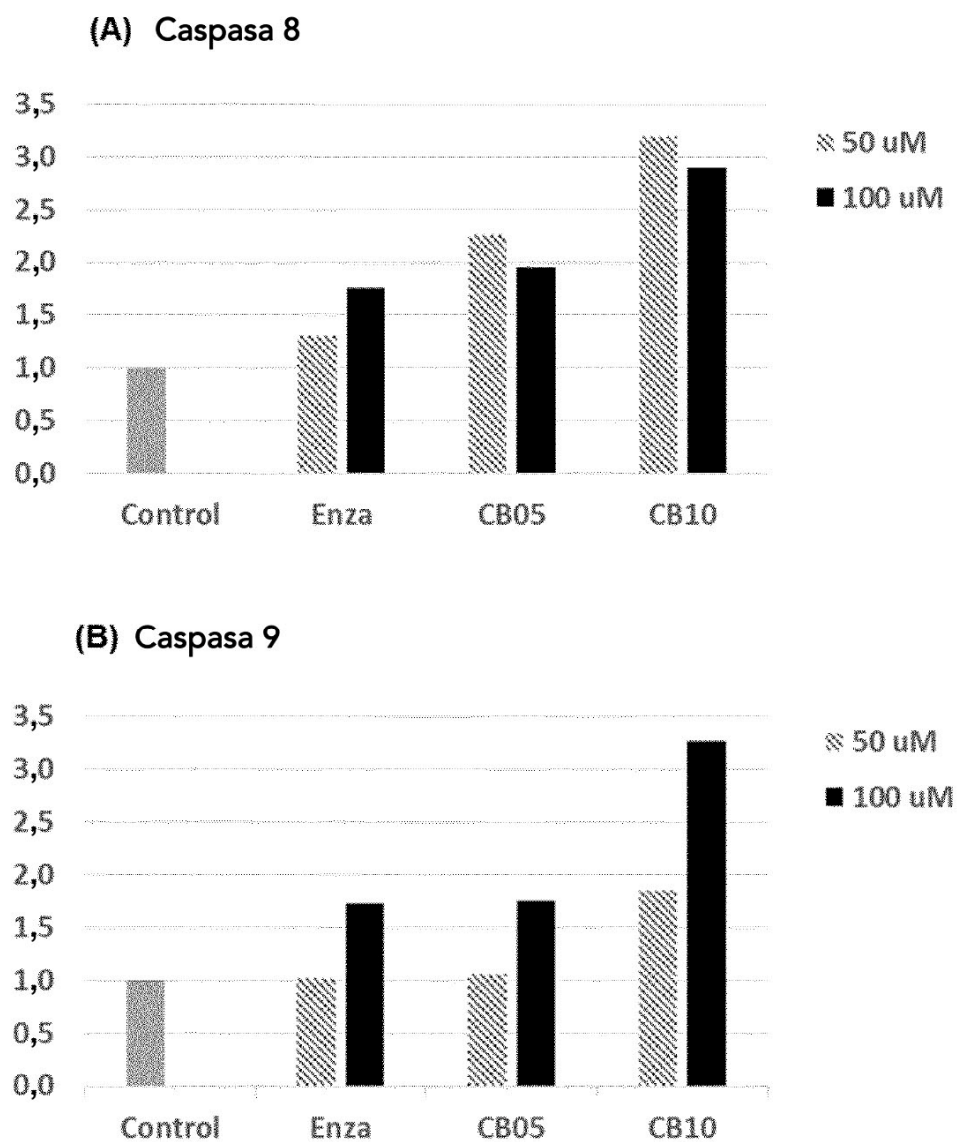


Figura 12

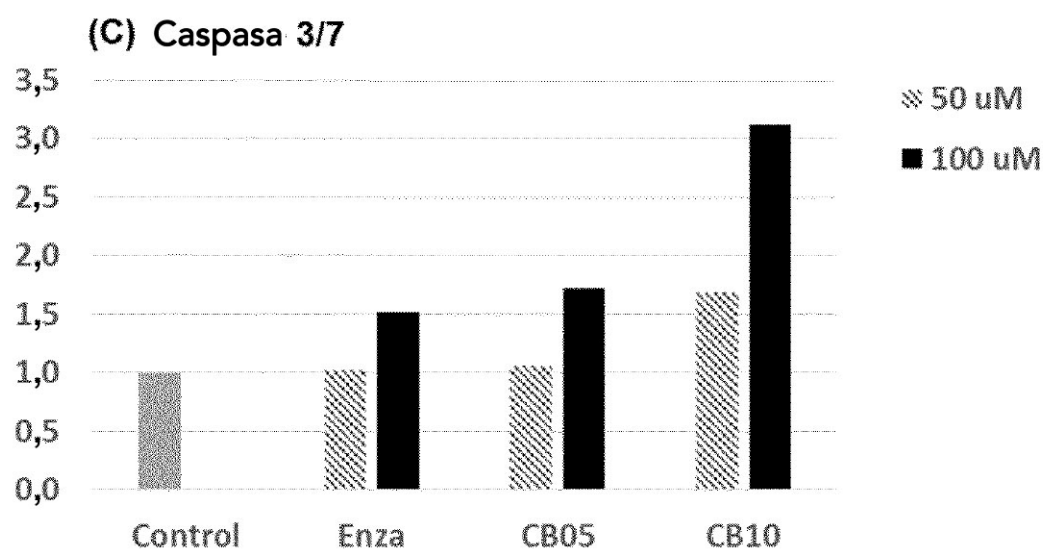
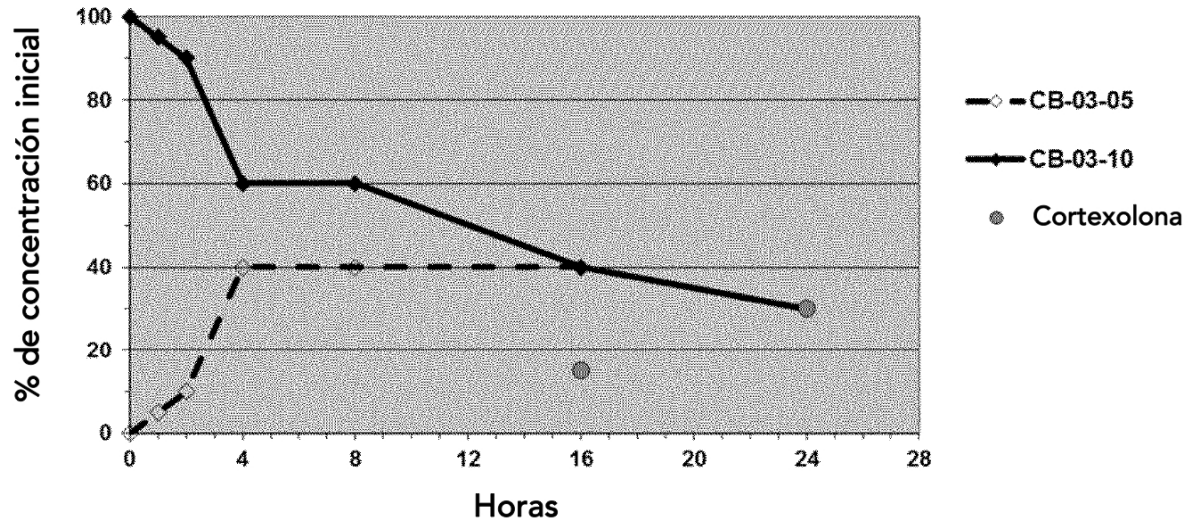


Figura 12

(A) SER HUMANO



(B) RATA

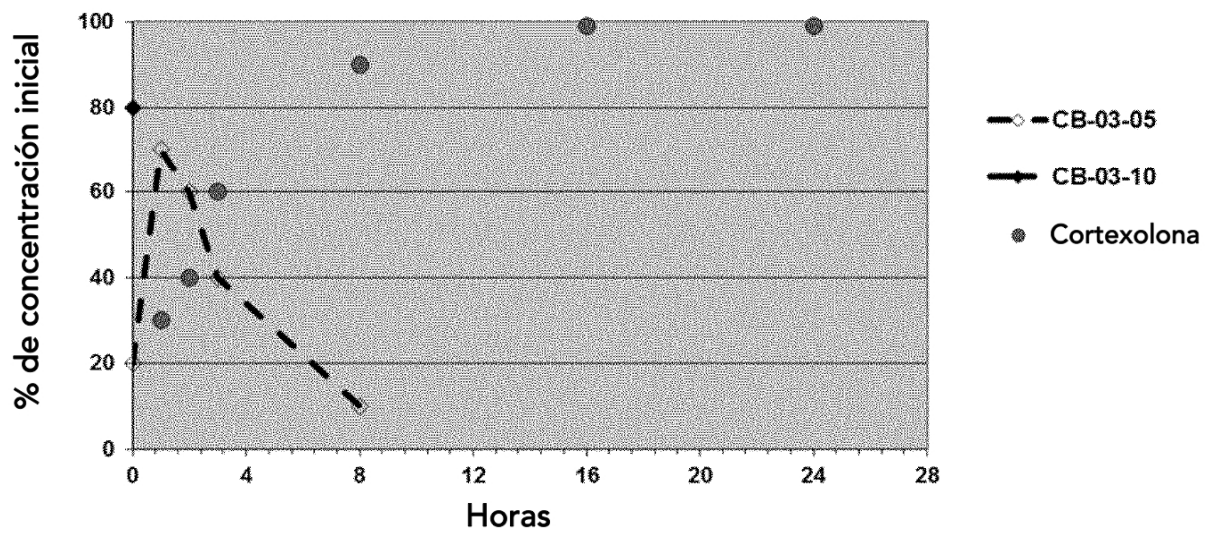
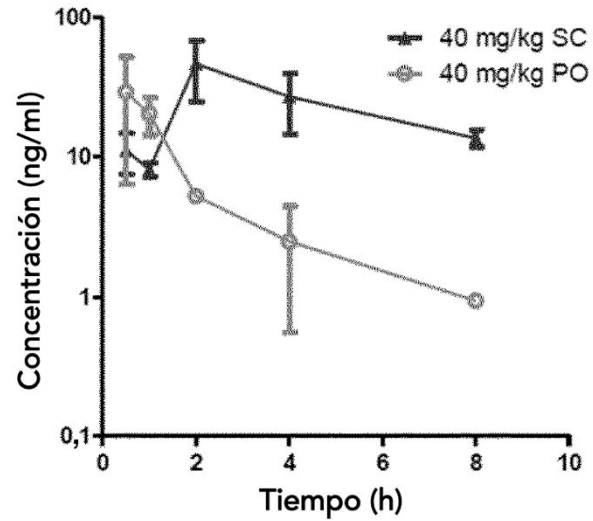


Figura 13

Farmacocinética de CB-03-05 en ratones
después de la administración SC y PO de CB-03-10



Vía	Dosificación	T_{max}	C_{max}	$T_{1/2}$	MRT_{last}	MRT_{inf}	AUC_{last}	AUC_{inf}
		(hr)	(ng/mL)	(hr)	(hr)	(hr)	(hr*ng/mL)	(hr*ng/mL)
SC	40	2	46,2	3,49	3,64	6,14	189	258
PO	40	0,5	29,1	2,47	1,77	2,42	47	50,4

Figura 14

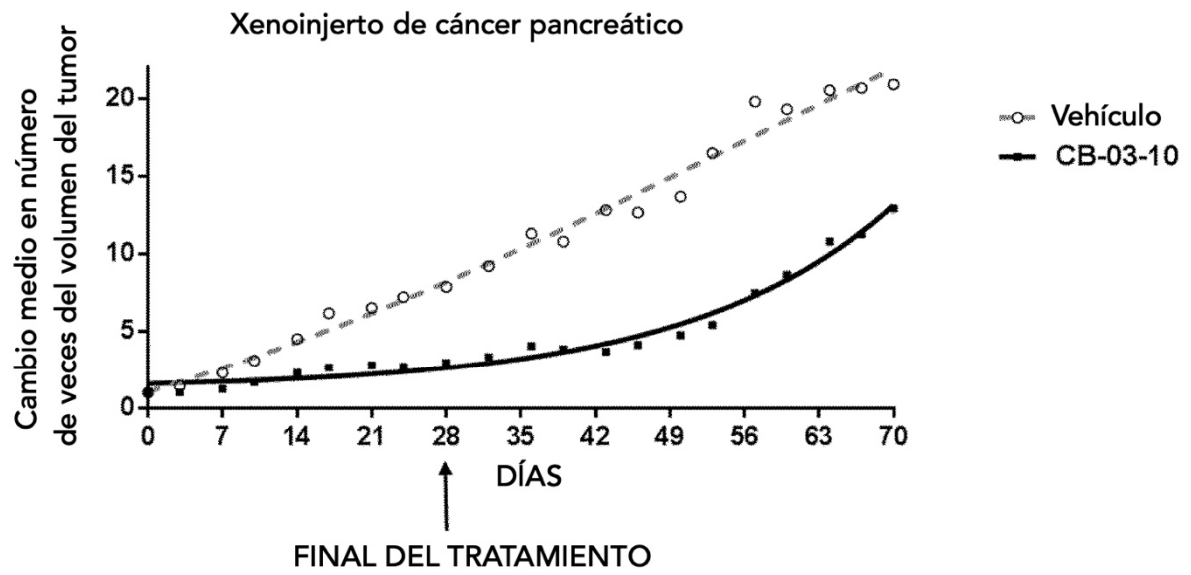


Figura 15

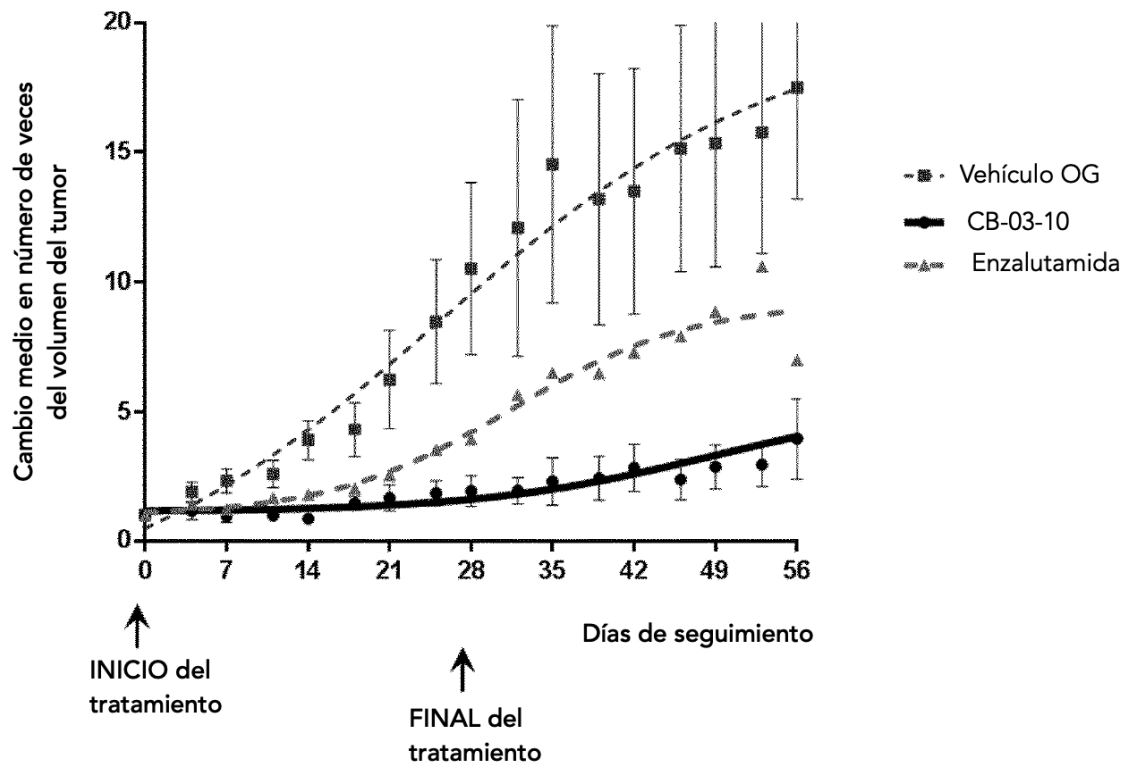


Figura 16

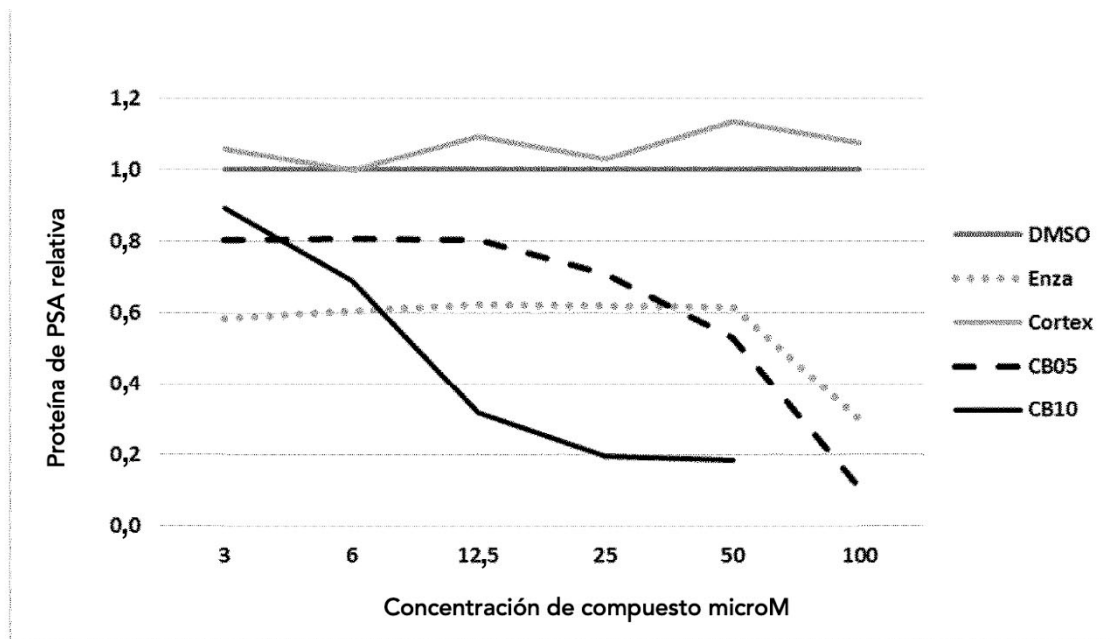


Figura 17

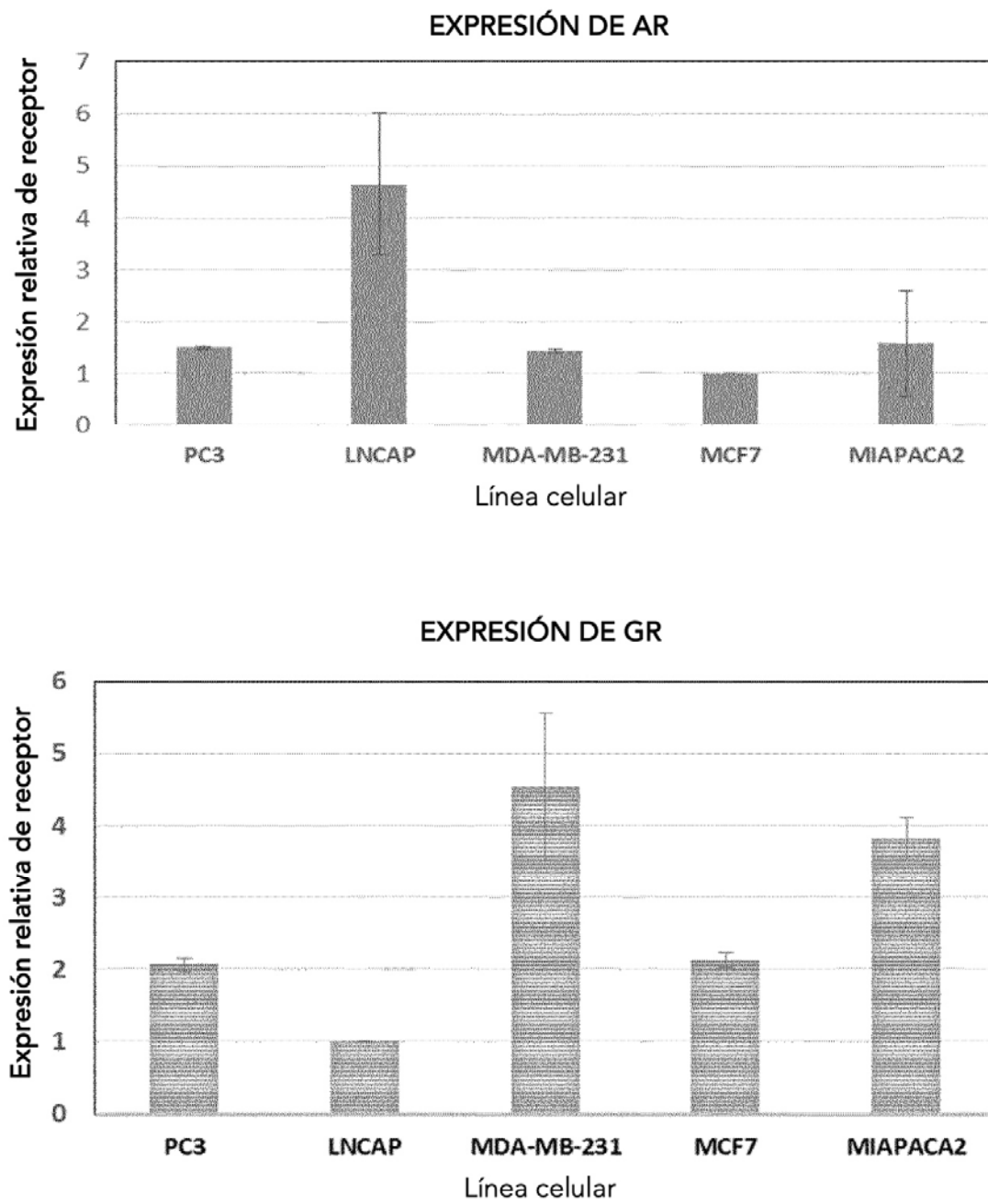


Figura 18