

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 094**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/573** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2015 PCT/EP2015/073176**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16055537**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2015 E 15775455 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3204012**

54 Título: **17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona para su 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:

**16.02.2021**

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 2 806 094 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**

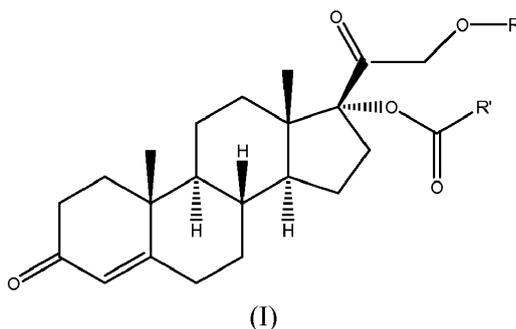
17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona para su uso en el tratamiento de tumores

**5 SOLICITUDES RELACIONADAS**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad bajo 35 USC § 119 a la Solicitud de Patente Europea N° 14188063.3 , titulada "17 $\alpha$ -monoesters and 17 $\alpha$ , 21-diesters of cortexolone for use in the treatment of tumors" presentada el 8 de octubre de 2014.

10

En un contexto general, la presente invención describe ciertos derivados de cortexolona de fórmula (I)



15 y los mismos para su uso como principios activos antitumorales para el tratamiento curativo o adyuvante, o neoadyuvante o paliativo de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, incluidas neoplasias malignas y metástasis.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un derivado de cortexolona de fórmula (I) como principio activo con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable, y a las mismas composiciones farmacéuticas para su uso como medicamentos antitumorales para el tratamiento curativo o adyuvante, o neoadyuvante o paliativo de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, incluidas neoplasias malignas y metástasis.

**25 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

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

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

Los tumores epiteliales son neoplasias derivadas de células epiteliales, el tipo de célula que reviste los órganos internos huecos y las superficies corporales; este grupo incluye muchos de los cánceres más comunes e incluye a la mayoría de los que se desarrollan en el seno, la próstata, el pulmón, el páncreas y el tracto gastrointestinal.

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

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

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

45 El cáncer de páncreas es una de las formas más letales de carcinomas. Las células exocrinas y endocrinas del páncreas forman tipos de tumores completamente diferentes. Los tumores pancreáticos exocrinos constituyen el tipo más común de cáncer de páncreas (más del 95 %). Aunque en el páncreas pueden desarrollarse 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 más frecuentes de muerte en los hombres y es la cuarta causa de muerte en las mujeres. Es uno de los tumores con mayor pronóstico desfavorable, con una supervivencia de solo el 5 % en varones y el 6 % en las mujeres a los 5 años después del diagnóstico. La mayor incidencia se produce entre los 60 y 70 años de edad (AIOM. Linea Guida Carcinoma del Pancreas Esocrino, ed. 2013).

Se desconoce la etiología del carcinoma de páncreas exocrino. Existe una predisposición genética reconocida (familiaridad) y algunos factores de riesgo tales como el tabaquismo, la dieta grasa, la diabetes mellitus tipo 2, la pancreatitis crónica, factores ambientales tales como disolventes o pesticidas.

El carcinoma de páncreas exocrino es, en su fase inicial, asintomático, y esto explica el retraso en el diagnóstico, que generalmente se realiza cuando la enfermedad está en una fase avanzada, con excepción de la detección accidental durante los procedimientos de diagnóstico para otras enfermedades abdominales.

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

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

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

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

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

Theve y col., en 1983 revisaron los posibles efectos de las hormonas sexuales sobre el páncreas, basándose en informes sobre proteínas receptoras de esteroides en el tejido pancreático, la alta capacidad de la proteína de unión a estrógenos en el páncreas humano y la capacidad del tejido pancreático humano para convertir el estrógeno periférico principal, sulfato de estrona, en el estradiol-17 beta biológicamente activo terminal.

Con estos antecedentes, probaron el tamoxifeno (un antagonista del receptor de estrógenos) en pacientes con adenocarcinoma no extirpable del páncreas con algunos resultados preliminares similares a los de Wong y col., en 1993.

La práctica clínica en los años siguientes no dio los resultados esperados, pero la conclusión fue que, incluso si los antiestrógenos no constituían la forma óptima de terapia, se debería intentar otro tipo de manipulación hormonal en el cáncer de páncreas. En vista de lo anterior, existe una gran necesidad de nuevos enfoques para el tratamiento de tumores y, en particular, para el tratamiento de carcinomas, y aún más especialmente para el tratamiento de tumores epiteliales, especialmente carcinoma prostático o carcinoma de páncreas (preferentemente carcinoma de páncreas exocrino).

En la técnica se conocen varios compuestos denominados 17 $\alpha$ -monoésteres, 21-monoésteres y 17 $\alpha$ , 21-diésteres de cortexolona y procedimientos para su fabricación. El documento WO03/014141 describe compuestos que pertenecen a la familia de los esteroides estructuralmente relacionados con la cortexolona (también conocida como 11-desoxicortisona) por tener principalmente actividad antiandrogénica. Estos compuestos, tales como el 17 $\alpha$ -propionato de cortexolona, actúan interfiriendo en la acción directa de las hormonas androgénicas sobre el receptor de andrógenos (AR) en los tejidos.

El documento WO2007/031349 describe 17 $\alpha$ -ésteres de C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> de 9,11-deshidrocortexolona, un derivado estructuralmente relacionado con cortexolona, como agentes antigonadotrópicos, que pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos estrechamente relacionados con el exceso de producción de gonadotropina.

El documento WO2009/019138 describe un procedimiento enzimático para la obtención de 17 $\alpha$ -monoésteres de cortexolona y de 9,11-deshidrocortexolona; además, también describe la existencia de varias formas cristalinas de 17 $\alpha$ -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 considera la terapia estándar para el tratamiento de tumores sensibles a los andrógenos, especialmente el cáncer de próstata. La terapia estándar con acetato de ciproterona resultó bastante ineficaz en los tumores con expresión reducida o ausente del receptor de andrógenos (Br. J. Cancer (1989), 60, 789-792). Corbishley y col. (CANCER, vol. 57, no. 10, 1986, páginas 1992-1995) enseñan que el tratamiento anti-andrógenos con CPA disminuye con éxito el crecimiento de carcinoma pancreático de xenoinjerto en ratones que expresa receptores de andrógenos.

Se sabe en la técnica que la presencia de esterificación 17 $\alpha$  confiere a los 17 $\alpha$ -ésteres de cortexolona diferentes actividades antiandrogénicas, demostradas en animales ( Celasco y col. Arzneim-Forsch 2005; 5: 581-7). Ferraboschi y col. (MED. CHEM. COMM., Vol. 5, no. 7, 2014, páginas 904-914) describen la actividad antiandrogénica y glucocorticoide del 17 $\alpha$ -propionato de cortexolona.

Ahora se ha descubierto sorprendentemente que los 17 $\alpha$ (alfa)-monoésteres, 21-monoésteres y 17 $\alpha$ (alfa),21-diésteres de cortexolona tienen efectos antitumorales inesperados, tanto en células de cáncer aisladas como en carcinomas de próstata y pancreático de xenoinjerto en los animales.

El efecto antitumoral de la invención fue evidente tanto en las células de carcinoma que albergan el receptor de andrógenos (AR<sup>+</sup>), como en el caso de las células de cáncer de próstata LNCaP o las células de cáncer de páncreas Panc1, y, muy sorprendentemente, también en células con expresión ausente o reducida del receptor de andrógenos (AR<sup>-</sup>), como las células de cáncer de próstata PC3, o células de cáncer de páncreas MiaPaca. El efecto antitumoral de la invención también fue evidente en carcinomas mamarios y carcinomas del tracto GI.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

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

Figura 1: cambio promedio en el volumen del tumor pancreático, medido relativamente al inicio del tratamiento, en el modelo animal de xenoinjerto de ratones desnudos (línea celular pancreática MiaPaca) con 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (en la figura denominado "06" y "CB-03-06") a dosis baja (230  $\mu$ M) y a dosis alta (1150  $\mu$ M). La referencia a "Vehículo" es un grupo tratado con control con el 0,4 % (v/v) de Tween 80 y el 0,5 % (p/v) de carboximetilcelulosa en solución salina normal. Los ratones fueron tratados con el compuesto y el vehículo SC diariamente durante 28 días consecutivos. La flecha de detención del tratamiento se refiere al día en que finalizó el tratamiento.

Figura 2: cambio promedio en el volumen del tumor pancreático, medido relativamente al inicio del tratamiento, en el modelo animal de xenoinjerto de ratones desnudos (línea celular pancreática MiaPaca) con 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona (en la figura denominado "10" y "CB-03-10") a dosis baja (230  $\mu$ M) y a dosis alta (1150  $\mu$ M). La referencia a "Vehículo" es un grupo tratado con control con el 0,4 % (v/v) de Tween 80 y el 0,5 % (p/v) de carboximetilcelulosa en solución salina normal. Los ratones fueron tratados con el compuesto y el vehículo SC diariamente durante 28 días consecutivos. La flecha de detención del tratamiento se refiere al día en que finalizó el tratamiento.

Figura 3: cambio promedio en el volumen del tumor pancreático en relación con el inicio del tratamiento en el modelo animal de ratones desnudos (línea celular pancreática MiaPaca) tratados con acetato de ciproterona (en la figura denominado CPA), 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona (en la figura denominado "10") y 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (en la figura denominado "06") (cada compuesto a dosis baja y a dosis alta) y grupo de control tratado con vehículo (es decir, el 0,4 % (v/v) de Tween 80 y el 0,5 % (p/v) de carboximetilcelulosa en solución salina normal). Todos los ratones fueron tratados con el compuesto y el vehículo SC diariamente durante 28 días consecutivos (días de tratamiento). La flecha de detención del tratamiento se refiere al día en que finalizó el tratamiento.

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

Figura 5: titulación de dosis de citotoxicidad de compuestos derivados de cortexolona en líneas celulares de cáncer

- de próstata (a) y de páncreas (b) humanas.  
 Figura 6: niveles de expresión de AR en líneas celulares de cáncer.  
 Figura 7: actividad antagonista de glucocorticoides de CB-03-06.  
 Figura 8: actividad agonista de glucocorticoides de CB-03-06.  
 5 Figura 9: inducción de apoptosis por CB-03-06 en células MiaPaca2.  
 Figura 10: inducción de la detención del ciclo celular por diferentes concentraciones de CB-03-06 en células MiaPaca2.  
 Figura 11; evolución temporal de activación de caspasas en células MiaPaca2 (8-24-48 horas). 20  $\mu$ M (barras rayadas) o 50  $\mu$ M (barras sólidas) indican las concentraciones del compuesto.  
 10 Figura 12: evolución temporal de la activación de caspasa en líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP.  
 Figura 13: metabolismo *in vitro* de CB-03-06 en plasma (A) humano y (B) de rata.  
 Figura 14: farmacocinética de CB-03-06 evaluada *in vivo* en plasma de ratones después de la administración subcutánea y oral.  
 15 Figura 15: actividad antitumoral *in vivo* de CB-03-06 en el modelo de xenoinjerto en ratón de cáncer de páncreas cuando se administra por vía subcutánea.  
 Figura 16: actividad antitumoral *in vivo* de CB-03-06 en un modelo de xenoinjerto en ratón de cáncer de próstata cuando se administra por sonda oral.  
 Figura 17; inhibición por CB-03-06 de la secreción basal de PSA *in vitro* a partir de líneas celulares de cáncer LNCaP.  
 20 Figura 18: expresión del receptor de andrógenos y glucocorticoides en diferentes líneas celulares de cáncer.

## **DEFINICIONES**

A menos que se defina de otra forma, todos los términos, notaciones y otros términos o terminología científica de la técnica empleada en esta invención tienen los significados comúnmente comprendidos por los expertos en la materia a la que pertenece esta divulgación. En algunos casos, se definen en esta invención términos con significados comúnmente comprendidos con fines de claridad y/o para hacer una referencia específica; por tanto, la inclusión de dichas definiciones en esta invención no debe ser necesariamente interpretada como una representación de diferencia sustancial respecto a lo que generalmente se entiende en la técnica.

30 En particular, las expresiones "excipiente fisiológicamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" en esta invención se refieren a una sustancia desprovista de cualquier efecto farmacológico propio y que no produce reacciones adversas cuando se administra a un mamífero, preferentemente un ser humano. Los excipientes fisiológicamente aceptables son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el Handbook of  
 35 Pharmaceutical Excipients, sexta edición (2009).

El término "alquilo" como se usa en esta invención significa un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada.

40 El término "arilo" en esta invención se refiere a sistemas de anillos aromáticos mono y policarbocíclicos, donde los anillos carbocíclicos individuales en los sistemas de anillos policarbocíclicos pueden fusionarse o unirse entre sí mediante un enlace sencillo. Los grupos "arilo" adecuados comprenden, pero no se limitan a, fenilo, naftilo, bifenilo y similares.

45 El término "heteroarilo" en esta invención se refiere a un sistema de anillos aromáticos mono y policarbocíclicos que comprende al menos un heteroátomo en el sistema de anillo, donde dicho heteroátomo se selecciona en el grupo que comprende, pero no se limita a, nitrógeno, azufre, oxígeno y similares, y donde los anillos cíclicos individuales en los sistemas de anillos policarbocíclicos pueden fusionarse o unirse entre sí mediante un enlace sencillo. Los grupos "heteroarilo" adecuados comprenden, pero no se limitan a, piridilo, imidazolilo, pirrolilo, furilo, bencimidazolilo, tiofuranilo y similares.

50 El "grupo arilo" puede estar opcionalmente sustituido en al menos uno de los átomos de carbono del anillo con un grupo seleccionado de entre alquilo inferior, alquenilo inferior, haloalquilo inferior, haloalquenilo inferior, alcoxi inferior, haloalquenilo inferior, alquenilo inferior, halógeno, nitro, ciano, alquiltio inferior y similares.

55 El "grupo heteroarilo" puede estar opcionalmente sustituido en al menos uno de los átomos de carbono o en al menos uno de los heteroátomos del anillo con un grupo seleccionado de entre alquilo inferior, haloalquilo inferior, alcoxi inferior, alquenilo inferior, haloalquenilo inferior, alquenilo inferior, halógeno, nitro, ciano, alquiltio inferior y similares.

60 El término "aproximadamente" en esta invención se refiere al intervalo del error experimental, que puede producirse en una medición.

Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como expresiones abiertas (es decir, que significan "que incluyen, pero no se limita a") y debe considerarse que incluyen y/o proporcionan soporte también para términos como "consisten esencialmente en", "que consisten esencialmente en", "consisten en" o "que consisten en".

Las expresiones "consisten esencialmente en", "que consisten esencialmente en" deben interpretarse como expresiones semicerradas, lo que significa que no se incluyen otros ingredientes que afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la invención (por tanto, pueden incluirse excipientes opcionales).

10

Las expresiones "consiste en", "que consiste en" deben interpretarse como una expresión cerrada.

Como se usan en esta invención, las expresiones "cantidad terapéuticamente efectiva" y "cantidad efectiva" 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, duración, progresión o aparición de una enfermedad, trastorno o afección, prevenir el avance, recurrencia o progresión de una enfermedad, trastorno o afección o síntoma asociado con una enfermedad, trastorno o afección. La cantidad precisa de compuesto administrado a un sujeto dependerá de la vía de administración, el tipo y la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección y de las características del sujeto, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a fármacos. El experto en la materia será capaz de determinar las dosificaciones apropiadas en función de estos y otros factores. Se conocen las dosificaciones adecuadas de los agentes aprobados y el experto en la materia puede ajustarlas según el estado del sujeto, el tipo de afección o afecciones que se estén tratando y la cantidad de un compuesto descrito en esta invención que se esté usando. En los casos en los que no se indica expresamente una cantidad, debe suponerse una cantidad efectiva. Por ejemplo, los compuestos y las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención pueden administrarse a un sujeto en un intervalo de dosificación de entre aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal/día para tratamiento terapéutico.

Como se usando en esta invención, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a tratamientos terapéuticos que incluyen la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de una enfermedad, trastorno o afección, o la mejora de uno o más síntomas (específicamente, uno o más síntomas discernibles) de una enfermedad, trastorno o afección, que resultan de la administración de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos tales como un compuesto de la invención). En realizaciones específicas, el tratamiento terapéutico incluye la mejora de al menos un parámetro físico medible de una enfermedad, trastorno o afección. En otras realizaciones, el tratamiento terapéutico incluye la inhibición de la progresión de una afección, ya sea físicamente, por ejemplo, mediante estabilización de un síntoma discernible o fisiológicamente, por ejemplo, mediante la estabilización de un parámetro físico, o de ambas maneras. En otras realizaciones, el tratamiento terapéutico incluye la reducción o estabilización de una enfermedad, trastorno o afección.

La expresión "tratamiento curativo" como se usa en esta invención se refiere a un tratamiento que tiene como objetivo curar una enfermedad o mejorar los síntomas asociados con una enfermedad.

La expresión "tratamiento paliativo" como se usa en esta invención se refiere a un tratamiento o terapia que no tiene como objetivo curar una enfermedad sino más bien proporcionar alivio.

La expresión "tratamiento adyuvante" como se usa en esta invención se refiere a un tratamiento que se administra además del tratamiento primario, principal o inicial.

La expresión "tratamiento neoadyuvante", como se usa en esta invención, se refiere a un tratamiento que se administra antes de un tratamiento principal, con el objetivo de reducir el tamaño o la extensión de un tumor, reduciendo así las consecuencias de una técnica de tratamiento más extensa que sería necesaria si no se hubiera reducido el tamaño o la extensión del tumor.

Como se describe en esta invención, los compuestos de la invención pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes, tales como los ilustrados de manera general más adelante o como se ejemplifica mediante especies particulares de la invención. Se apreciará que la frase "opcionalmente sustituido" se usa de manera intercambiable con la frase "sustituido o sin sustituir". En general, el término "sustituido", precedido o no por el término "opcionalmente", se refiere al reemplazo de uno o más radicales de hidrógeno en una estructura determinada con el radical de un sustituyente especificado. A menos que se indique lo contrario, un grupo opcionalmente sustituido puede tener un sustituyente en cada posición sustituible del grupo. Cuando más de una posición en una estructura determinada se puede sustituir con más de un sustituyente seleccionado de entre un grupo especificado, el sustituyente puede ser el

mismo o diferente en cada posición. Cuando la expresión "opcionalmente sustituido" precede a una lista, dicha expresión se refiere a todos los grupos sustituibles posteriores en esa lista. Si un radical o estructura sustituyente no se identifica o define como "opcionalmente sustituido", el radical o estructura sustituyente no está sustituido.

- 5 La selección de sustituyentes y combinaciones de sustituyentes previstas en esta invención son las que dan lugar a la formación de compuestos estables o químicamente viables. El término "estable", como se usa en esta invención, se refiere a compuestos que no se alteran sustancialmente cuando se someten a condiciones para permitir su producción, detección y, específicamente, su recuperación, purificación y uso para uno o más de los fines descritos en esta invención. En algunas realizaciones, un compuesto estable o químicamente viable es uno que no se altera sustancialmente al mantenerse a una temperatura de 40°C o menos, sin humedad u otras condiciones químicamente reactivas, durante al menos una semana. Solo se contemplan aquellas elecciones y combinaciones de sustituyentes que dan como resultado una estructura estable. Dichas elecciones y combinaciones serán evidentes para los expertos en la materia y pueden determinarse sin experimentación innecesaria.
- 10
- 15 La expresión "administración simultánea, separada o secuencial" en esta invención se refiere a la administración del primer y segundo compuesto al mismo tiempo o de tal manera que los dos compuestos actúan en el cuerpo del paciente al mismo tiempo o la administración de un compuesto después del otro compuesto de tal manera que proporcionen 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 de la administración del otro compuesto.
- 20

Como se usan en esta invención, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente. Los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a un animal (por ejemplo, un pájaro, tal como un pollo, codorniz o pavo, o un mamífero), específicamente un "mamífero" incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, oveja, conejo, cobaya, rata, gato, perro y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, chimpancé y un ser humano) y, de forma más específica, un ser humano. En una realización, el sujeto es un ser humano.

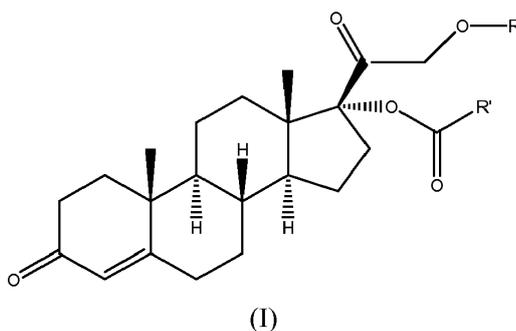
25

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 Ahora se ha descubierto sorprendentemente que algunos derivados de cortexolona tienen propiedades antitumorales terapéuticamente interesantes, contra tumores, preferentemente epiteliales y/o tumores dependientes de hormonas.

Según el concepto general, la presente invención describe los compuestos de fórmula I

35

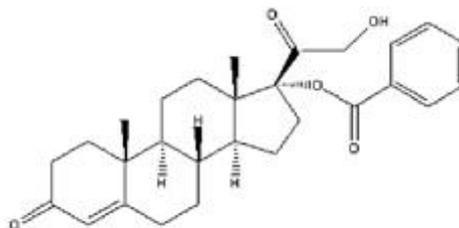


donde R es hidrógeno o C(O)-R<sub>1</sub>, donde R<sub>1</sub> es una cadena de alquilo lineal que contiene de 2 a 5 átomos de carbono, y donde R' es una cadena de alquilo lineal que contiene de 3 a 6 átomos de carbono o un grupo arilo opcionalmente sustituido o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido. Los compuestos preferidos de fórmula (I) son aquellos donde R es hidrógeno o C(O)-R<sub>1</sub>, donde R<sub>1</sub> CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> y donde R' es -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub> o fenilo.

40

El compuesto de fórmula (I) según la presente invención es el compuesto donde R es hidrógeno y R' es fenilo, es decir, 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (en esta invención también denominado "06" o "CB-03-06"), cuyas fórmulas se notifican a continuación.

45



17α-benzoato de cortisolona

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

5 Los compuestos descritos en esta invención pueden existir en forma libre o, cuando sea apropiado, como sales. Esas sales que son farmacéuticamente aceptables son de particular interés ya que son útiles en la administración de los compuestos descritos a continuación para fines médicos. Las sales que no son farmacéuticamente aceptables son útiles en procesos de fabricación, para fines de aislamiento y purificación, y en algunos casos, para su uso en la separación de formas estereoisoméricas de los compuestos de la invención o intermedios de los mismos.

10 Como se usa en esta invención, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de un compuesto que son adecuadas, dentro del alcance de la opinión médica bien fundada, para su uso en contacto con los tejidos humanos y de animales inferiores sin producir efectos secundarios indebidos, tales como toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares y son proporcionales a una relación razonable de beneficio/riesgo.

15 Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica, Por ejemplo, S. M. Berge y col., describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en esta invención incluyen las derivadas de bases y ácidos orgánicos e inorgánicos adecuados. Estas sales se pueden preparar in situ durante el aislamiento y la purificación  
20 finales de los compuestos.

Debe entenderse que esta invención incluye mezclas/combinaciones de diferentes sales farmacéuticamente aceptables y también mezclas/combinaciones de compuestos en forma libre y sales farmacéuticamente aceptables.

25 Además de los compuestos descritos en esta invención, solvatos (por ejemplo, hidratos) y clatratos farmacéuticamente aceptables de estos compuestos también se pueden utilizar en composiciones para tratar o prevenir los trastornos identificados en esta invención

30 Como se usa en esta invención, la expresión "solvato farmacéuticamente aceptable" es un solvato formado a partir de la asociación de una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptable a uno de los compuestos descritos en esta invención. El término "solvato" incluye hidratos (por ejemplo, hemihidrato, monohidrato, dihidrato, trihidrato, tetrahidrato y similares).

35 Como se usa en esta invención, el término "hidrato" significa un compuesto descrito en esta invención o una sal del mismo, que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de agua unida por fuerzas intermoleculares no covalentes.

40 Como se usa en esta invención, el término "clatrato" significa un un compuesto descrito en esta invención o una sal del mismo, en forma de una red cristalina que contiene espacios (por ejemplo, canales) que tienen una molécula huésped (por ejemplo, un disolvente o agua) atrapada en ella.

Además de los compuestos descritos en esta invención, derivados o profármacos farmacéuticamente aceptables de estos compuestos también se pueden utilizar en composiciones para tratar o prevenir los trastornos identificados en esta invención.

45 Un "derivado o profármaco farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier éster, sal de un éster u otro derivado o sal del mismo farmacéuticamente aceptable de un compuesto descrito en esta invención que, tras la administración a un receptor, es capaz de proporcionar, ya sea directa o indirectamente, un compuesto descrito en esta invención o un metabolito inductor activo o un residuo del mismo. Los derivados o profármacos particularmente favorecidos son  
50 aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos cuando dichos compuestos se administran a un paciente (por ejemplo, permitiendo que un compuesto administrado por vía oral se absorba más fácilmente en la

sangre) o que mejoran el suministro del compuesto original a un compartimento biológico (por ejemplo, el cerebro o el sistema linfático) en relación con la especie parental.

Los profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en esta invención incluyen, sin limitación, 5 ésteres, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, sales metálicas y ésteres de sulfonato.

### **Usos médicos**

Un objetivo de la presente invención está representado por el 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (CB-03-06) para su uso 10 como medicamento.

En otro aspecto, la invención se refiere a 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona para su uso en terapia como modulador del receptor de glucocorticoides, preferentemente un agonista de glucocorticoides. En otro aspecto más, la invención se refiere a 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por 15 glucocorticoides.

En todavía otro aspecto, la invención se refiere a 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona para su uso en el tratamiento de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, que incluyen neoplasias malignas y metástasis; según otro aspecto, dicho tratamiento puede ser curativo, adyuvante, neoadyuvante o paliativo. 20

Idealmente, el 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona es para su uso en terapia como agente antitumoral.

En una realización, dichas enfermedades tumorales son tumores sólidos, preferentemente tumores epiteliales, tales como, a modo de ejemplo, carcinoma de próstata, carcinoma mamario, carcinoma pancreático, carcinoma de pulmón, 25 carcinoma del tracto gastrointestinal (preferentemente carcinoma de colon), cáncer de riñón, carcinoma de tiroides, carcinoma uterino y carcinoma suprarrenal y similares.

En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, dichos tumores epiteliales son carcinoma de próstata (preferentemente carcinoma pancreático exocrino), carcinoma del tracto gastrointestinal (preferentemente carcinoma de colon) y carcinoma mamario (preferentemente cáncer de mama triple negativo (TNBC)). 30

En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata. En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, el cáncer de próstata es un adenocarcinoma. En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, las enfermedades tumorales 35 son cáncer de próstata con expresión ausente o reducida del receptor de andrógenos. En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con receptores de andrógenos mutados o truncados.

Idealmente, el 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (CB-03-06) es para su uso como un agente antitumoral donde las 40 enfermedades tumorales son cáncer de próstata con receptores de andrógenos mutados o truncados. Un uso particularmente ventajoso de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (CB-03-06) es para el tratamiento de cánceres de próstata que son o se han vuelto resistentes al tratamiento antiandrogénico, tal como la enzalutamida. Esta es una realización particularmente ventajosa de la invención, ya que recientemente se ha descubierto que después de 6 meses de tratamiento, el 30 % de los cánceres se volvieron resistentes a la enzalutamida porque el AR ha mutado o cambiado. 45 Curiosamente, estas células cancerosas resistentes regulan positivamente el GR. El 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (CB-03-06) puede tratar dichos cánceres, ya que la actividad también está mediada por el GR.

En otra realización preferida de la invención descrita en esta invención, el carcinoma pancreático exocrino es un adenocarcinoma. En una realización preferida, el cáncer de páncreas exocrino con expresión ausente o reducida del 50 receptor de andrógenos.

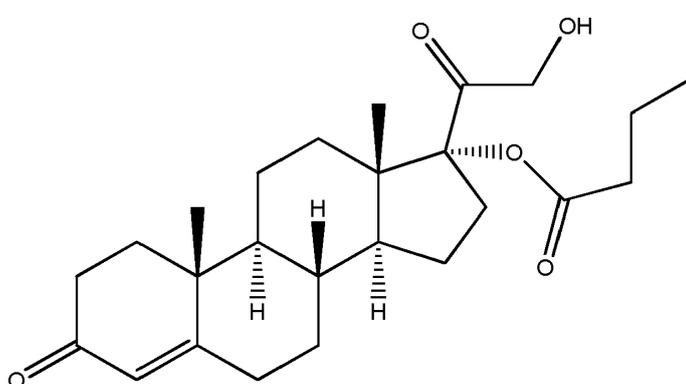
En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, dichos tumores epiteliales son carcinoma del tracto gastrointestinal (preferentemente carcinoma de colon).

55 En todavía una realización preferida de la invención descrita en esta invención, dichos tumores epiteliales son carcinoma mamario (preferentemente cáncer de mama triple negativo). Opcionalmente, el sujeto o paciente que se está tratando no responde a o sufre una recaída con la terapia convencional.

En una realización preferida, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) donde R es hidrógeno y 60 R' es fenilo, es decir, 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (en esta invención también denominado "06" o "CB-03-06"), para

su uso en el tratamiento de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, incluidas neoplasias malignas y metástasis; según otro aspecto, dicho tratamiento puede ser curativo, adyuvante, neoadyuvante o paliativo. Otra divulgación de la presente invención es el 17 $\alpha$ -valerato de cortexolona (en esta invención también denominado "05" o "CB-03-05"), representado por:

5

CB-03-05 (17 $\alpha$ -valerato de cortexolona)

para su uso como medicamento. CB-03-05 (17 $\alpha$ -valerato de cortexolona) se analizará a continuación y se puede usar como medicamento para tratar las mismas afecciones que las descritas anteriormente en relación con el 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (CB-03-06).

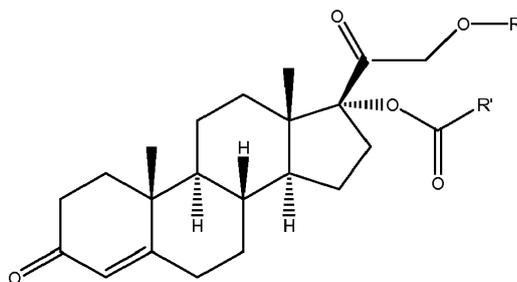
Otra divulgación de la presente invención son los compuestos de fórmula I, preferentemente 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona o 17 $\alpha$ -valerato de cortexolona, o formulaciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos, para su uso en la fabricación de medicamentos. Por ejemplo, los compuestos de fórmula I, preferentemente 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona o 17 $\alpha$ -valerato de cortexolona, o formulaciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos pueden ser para su uso en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, que incluyen neoplasias malignas y metástasis; según otro aspecto, dicho tratamiento puede ser curativo, adyuvante, neoadyuvante o paliativo. Idealmente, estos compuestos o formulaciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos son para su uso en la fabricación de un agente antitumoral,

En una realización, dichas enfermedades tumorales son tumores sólidos, preferentemente tumores epiteliales, tales como, a modo de ejemplo, carcinoma de próstata, carcinoma mamario (preferentemente cáncer de mama triple negativo), carcinoma pancreático (preferentemente carcinoma pancreático exocrino), carcinoma de pulmón, carcinoma del tracto gastrointestinal (preferentemente carcinoma de colon), cáncer de riñón, carcinoma de tiroides, carcinoma uterino y carcinoma suprarrenal y similares.

En otro aspecto, la invención describe compuestos de fórmula I, 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona o 17 $\alpha$ -valerato de cortexolona, o formulaciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos, para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno mediado por glucocorticoide.

En un aspecto, la invención describe un procedimiento para tratar lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, que incluyen neoplasias malignas y metástasis, comprendiendo dicho procedimiento la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I) a un sujeto que lo necesite:

35



(I)

donde R es hidrógeno o C(O)-R<sub>1</sub>, donde R<sub>1</sub> es una cadena de alquilo lineal que contiene de 2 a 5 átomos de carbono, y donde R' es una cadena de alquilo lineal que contiene de 3 a 6 átomos de carbono o un grupo arilo opcionalmente sustituido o un grupo heteroarilo opcionalmente sustituido, a un mamífero que lo necesite. Preferentemente, dicho mamífero es un ser humano.

Preferentemente, la invención describe un procedimiento para tratar lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, que incluyen neoplasias malignas y metástasis, comprendiendo dicho procedimiento la administración de una cantidad efectiva de un 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona o 17 $\alpha$ -valerato de cortexolona a un mamífero que lo necesite. Preferentemente, dicho mamífero es un ser humano.

La invención describe un procedimiento para tratar tumores, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz de un 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona o 17 $\alpha$ -valerato de cortexolona a un mamífero que lo necesite. En estas realizaciones, dichas enfermedades tumorales son tumores sólidos, particularmente tumores epiteliales, tales como, a modo de ejemplo, carcinoma de próstata, carcinoma mamario (preferentemente cáncer de mama triple negativo), carcinoma uterino, carcinoma pancreático (preferentemente carcinoma pancreático exocrino), carcinoma de pulmón, carcinoma del tracto gastrointestinal (preferentemente carcinoma de colon), cáncer de riñón, carcinoma de tiroides, carcinoma uterino y carcinoma suprarrenal y similares.

En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, dichos tumores epiteliales son carcinoma de próstata, carcinoma pancreático, más preferentemente carcinoma pancreático exocrino o carcinoma mamario, tal como cáncer de mama triple negativo. Opcionalmente, el sujeto o paciente que se está tratando no responde a o sufre una recaída con la terapia convencional.

Dicho procedimiento comprende la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I) donde R es hidrógeno y R' es fenilo, es decir, 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona.

El compuesto de la presente invención puede usarse en diferentes aplicaciones terapéuticas, especialmente aplicaciones oncológicas.

El compuesto según la invención descrito en esta invención se ha encontrado particularmente efectivo para el tratamiento curativo o adyuvante, o neoadyuvante o paliativo del carcinoma pancreático, preferentemente carcinoma pancreático exocrino y carcinoma prostático.

A continuación, se encontrará una ilustración de las propiedades farmacológicas de los compuestos de la invención en la sección experimental.

Los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse según cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en el documento WO03/014141 y en el documento WO2009/019138. Según una realización de la invención, estos compuestos se pueden preparar según el procedimiento descrito en los ejemplos 10 y 11, respectivamente.

### **Composiciones farmacéuticas**

Los compuestos descritos en esta invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas que además comprenden un portador, diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención descrito en esta invención, y un portador, diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la presente invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador, diluyente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, diluyentes farmacéuticos, excipientes o portadores adecuadamente seleccionados con respecto a la forma de administración prevista, y consistentes con las prácticas farmacéuticas convencionales. Dicha composición farmacéutica comprende, como principio activo, 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (CB-03-06), en asociación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

Según otra divulgación, dicha composición farmacéutica comprende, como principio activo, 17 $\alpha$ -valerato de cortexolona (CB-03-05), en asociación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

En un objetivo adicional, dicha composición farmacéutica es para su uso como medicamento. En un objetivo adicional,

dicha composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, que incluyen neoplasias malignas y metástasis; según otro aspecto, dicho tratamiento puede ser curativo, adyuvante, neoadyuvante o paliativo.

5 En un objetivo adicional, dicha composición farmacéutica es para su uso como un agente antitumoral.

Preferentemente, dichas enfermedades tumorales son tumores sólidos. Más preferentemente, dichos tumores sólidos son tumores epiteliales, tales como, a modo de ejemplo, carcinoma de próstata, carcinoma mamario, carcinoma pancreático, carcinoma de pulmón, carcinoma del tracto gastrointestinal (preferentemente carcinoma de colon), cáncer de riñón, carcinoma de tiroides, carcinoma uterino y carcinoma suprarrenal y similares.

En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, dichos tumores epiteliales son carcinoma de próstata y carcinoma pancreático, más preferentemente carcinoma pancreático exocrino, carcinoma del tracto gastrointestinal (preferentemente carcinoma de colon) y carcinoma mamario (preferentemente cáncer de mama triple negativo).

En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata. En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, el cáncer de próstata es un adenocarcinoma. En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con expresión mutada, ausente o reducida del AR. De esta manera, el cáncer de próstata que se puede tratar según la invención puede ser o haberse vuelto resistente a la terapia dirigida antiandrogénica, tal como la enzalutamida.

En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, el carcinoma pancreático exocrino es un adenocarcinoma. En una realización preferida, el cáncer de páncreas exocrino con expresión ausente o reducida del AR.

En una realización preferida, el carcinoma mamario es cáncer de mama triple negativo (TNBC). Opcionalmente, el sujeto o paciente que se está tratando no responde a o sufre una recaída con la terapia convencional.

En otro objetivo de la presente invención, dicha composición farmacéutica comprende 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, que incluyen neoplasias malignas y metástasis; según otro aspecto, dicho tratamiento puede ser curativo, adyuvante, neoadyuvante o paliativo.

En un objetivo adicional, dicha composición farmacéutica es para su uso como un modulador del receptor de glucocorticoides (GR), preferentemente un antagonista de glucocorticoides.

En otro aspecto, la invención describe dicha composición farmacéutica para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno mediado por glucocorticoides.

Dicha composición farmacéutica comprende 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona.

Según otra realización, dicha composición farmacéutica puede contener al menos otro principio activo, preferentemente un principio activo quimioterapéutico, opcionalmente como una combinación, para administración simultánea, separada o secuencial. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma sólida, tal como, a modo de ejemplo, polvos, polvos liofilizados, gránulos, pastillas, comprimidos o cápsulas. Si se desea, también se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes. Los compuestos de la invención pueden estar también en forma microencapsulada con uno o más excipientes. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Los excipientes apropiados para las composiciones farmacéuticas sólidas se pueden seleccionar, sin ninguna limitación, de entre las categorías conocidas por un experto en la materia, tales como adsorbentes, cargas, tensioactivos, auxiliares de compresión, aglutinantes, lubricantes, desintegrantes, diluyentes, disgregantes, agentes promotores de flujo, agentes de liofilización, deslizantes, coadyuvantes de liofilización, agentes formadores de película, colorantes, antioxidantes y similares. A modo de ejemplo, se pueden seleccionar excipientes adecuados para composiciones farmacéuticas sólidas, de manera no limitativa, de entre fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa y sus derivados, polivinilpirrolidona, agentes de recubrimiento, tintes y ceras. Cualquier mezcla de estos excipientes se puede usar adecuadamente según la invención. Según la invención, las composiciones farmacéuticas sólidas tales como comprimidos, gránulos, pastillas, cápsulas y similares, pueden

formularse 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 administración por vía de administración oral o sublingual, o como implante.

- 5 La composición controlada, extendida y/o prolongada puede prepararse según cualquier procedimiento o sistema convencional, por ejemplo, según el documento WO00/76478. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, emulsiones, suspensiones o jarabes.

- Las formas de dosificación líquida para administración por vía oral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, y perfumantes.
- 10
- 15 Los excipientes apropiados para la composición farmacéutica líquida pueden seleccionarse, sin ninguna limitación, de entre las categorías bien conocidas por un experto en la materia, tales como disolventes, codisolventes, vehículos oleaginosos, agentes tamponantes, tensioactivos, agentes emulsionantes, agentes potenciadores de la solubilidad, agentes de suspensión, agentes solubilizantes, agentes quelantes, agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, antioxidantes, conservantes, agentes osmóticos, agentes de tonicidad, agentes de control de la viscosidad y similares.
- 20 A modo de ejemplo, los excipientes farmacéuticos adecuados para la preparación líquida pueden seleccionarse de entre 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, hidroxistearato de polioxilo 15, polisorbato 80, aceite de ricino de polioxilo 35, cloruro de sodio, fosfato de sodio, fosfato de potasio 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 mediante una técnica bien conocida por un experto en la materia, tal como esterilización por calor seco, esterilización por calor húmedo, radiación gamma, esterilización por haz de electrones y similares. En otra realización, las composiciones farmacéuticas líquidas se esterilizan por filtración estéril y se cargan asépticamente en los recipientes de envasado primarios finales. Las composiciones farmacéuticas líquidas según la invención descrita en esta invención pueden usarse para inyecciones, infusiones o perfusiones tales como administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o intratumoral.
- 25
- 30

### **Procedimientos de administración**

- 35 Los compuestos y composiciones farmacéuticas descritos en esta invención pueden administrarse por vía oral, por vía parenteral, por pulverización por inhalación, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal o mediante un depósito implantado. El término "parenteral", como se usa en esta invención, incluye, pero no se limita a, técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal.
- 40 Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, se pueden formular según la técnica conocida usando agentes humectantes o dispersantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico y parenteralmente aceptable. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua en condiciones estériles u otro medio inyectable estéril antes de su uso.
- 45 Las formas inyectables estériles de los compuestos y composiciones descritos en esta invención pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones se pueden formular según técnicas conocidas en la técnica que usan agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico y parenteralmente aceptable.
- 50 Los compuestos para su uso en los procedimientos de la invención se pueden formular en forma de dosificación unitaria. La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificación unitaria para sujetos que se someten 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.
- 55
- 60

La forma de dosificación unitaria puede ser para una dosis diaria única o una de múltiples dosis diarias (por ejemplo, aproximadamente 1 a 4 o más veces al día). Cuando se usan múltiples dosis diarias, la forma de dosificación unitaria puede ser la misma o diferente para cada dosis.

- 5 Según la invención, los compuestos de fórmula (I) o las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos se administran preferentemente por inyección intravenosa, más preferentemente a través de una bolsa de infusión o una jeringa o un catéter de bomba, o por inyección intramuscular, o por inyección subcutánea, o *per os* (por vía oral) en forma de comprimidos o cápsulas.
- 10 Según una realización, dicha composición farmacéutica está en forma líquida y es adecuada para inyección, y comprende un compuesto derivado de cortexolona de fórmula (I) en una cantidad que varía del 0,1 % al 50,0 % en peso respecto a volumen (p/v), preferentemente del 0,25 % al 25 % p/v, más preferentemente del 0,5 % al 10 % p/v, mucho más preferentemente del 1 % al 5 % p/v.
- 15 Según otra realización, dicha composición farmacéutica está en forma sólida y comprende un compuesto derivado de cortexolona de fórmula I en una cantidad que varía del 0,1 % al 50 % en peso respecto a peso (p/p), preferentemente del 0,5 % al 40 % p/p, más preferentemente del 1 % al 30 % p/p.

La cantidad del al menos un compuesto de fórmula (I) en dicha composición farmacéutica es tal que se puede obtener un nivel de dosificación efectivo tras la administración a un mamífero que padece lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, incluyendo neoplasias malignas y metástasis.

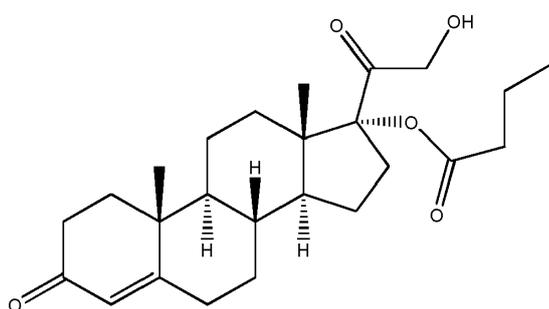
- 20 un nivel de dosificación efectivo tras la administración a un mamífero que padece lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, incluyendo neoplasias malignas y metástasis.
- 25 Los compuestos de fórmula (I) y la composición farmacéutica que los comprende como principios activos antitumorales para su uso en el tratamiento curativo o adyuvante, o neoadyuvante o paliativo de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, incluyendo neoplasias y metástasis malignas, se administran preferentemente a un mamífero, siendo dicho mamífero un ser humano o un animal, preferentemente un ser humano.

#### **Terapia de combinación**

- 30 Los compuestos de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (CB-03-06), 17 $\alpha$ -valerato de cortexolona (CB-03-05) y la composición farmacéutica que comprende dichos compuestos pueden contener al menos otro principio activo, preferentemente un principio activo quimioterapéutico, como una combinación para administración simultánea, separada o secuencial.
- 35 Los compuestos de fórmula (I) y la composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable según la invención pueden usarse en terapia de combinación con al menos otro fármaco, especialmente un fármaco quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención pueden administrarse simultáneamente con la administración de otro fármaco, especialmente un fármaco quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención pueden administrarse antes o después de la administración de otro fármaco, especialmente un fármaco quimioterapéutico. Dicho al menos otro fármaco, especialmente un fármaco quimioterapéutico, puede ser efectivo para tratar la misma o una diferente enfermedad, trastorno o afección. Los procedimientos de la presente divulgación incluyen la administración de uno o más compuestos de fórmula (I) o composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de fórmula (I) de la presente invención y al menos otro fármaco, preferentemente un fármaco quimioterapéutico, siempre que la administración combinada no inhiba la eficacia terapéutica del uno o más compuestos de la presente invención y/o no produce efectos de combinación adversos inaceptables.
- 40
- 45

#### **17 $\alpha$ -Valerato de cortexolona (en esta invención también denominado "05" o "CB-03-05")**

- 50 Como se ha descrito anteriormente, otra divulgación de la presente invención es el 17 $\alpha$ -valerato de cortexolona (en esta invención también denominado "05" o "CB-03-05"), representado por:



CB-03-05 (17 $\alpha$ -valerato de cortisolona)

para su uso como medicamento.

5

Idealmente, el 17 $\alpha$ -valerato de cortisolona es para su uso en el tratamiento de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, incluyendo opcionalmente neoplasias malignas y metástasis. Preferentemente, el 17 $\alpha$ -valerato de cortisolona es para su uso como agente antitumoral. Preferentemente, las enfermedades tumorales son tumores sólidos, preferentemente tumores epiteliales. Los tumores epiteliales pueden seleccionarse de entre carcinoma de próstata; carcinoma mamario; carcinoma pancreático (preferentemente cáncer pancreático exocrino); carcinoma de pulmón; carcinoma del tracto gastrointestinal, tal como carcinoma de colon; cáncer de riñón; carcinoma de tiroides; carcinoma uterino; y carcinoma suprarrenal.

10

Según una divulgación, el tumor epitelial es un carcinoma de próstata. En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con receptores de andrógenos mutados o truncados. De esta manera, el cáncer de próstata que se puede tratar según la invención puede ser o haberse vuelto resistente a la terapia dirigida antiandrogénica, tal como la enzalutamida.

15

Según otra divulgación, los tumores epiteliales son carcinoma pancreático, preferentemente carcinoma pancreático exocrino.

20

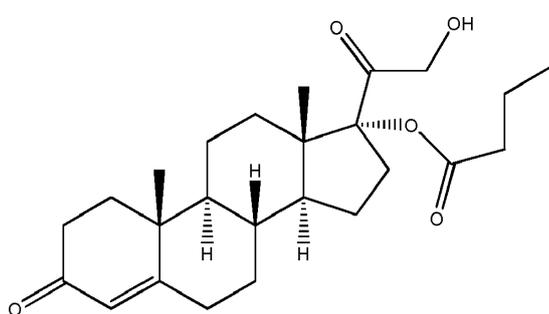
Según una divulgación, los tumores epiteliales son carcinoma mamario, preferentemente cáncer de mama triple negativo (TNBC). En una realización, el carcinoma mamario es cáncer de mama triple negativo y el sujeto está en recaída o no responde a la terapia convencional.

25

Según otra divulgación, los tumores epiteliales son carcinoma del tracto gastrointestinal, tal como carcinoma de colon.

Según otra divulgación, el 17 $\alpha$ -valerato de cortisolona es para su uso como un modulador del receptor de glucocorticoides (GR), preferentemente un antagonista de glucocorticoides. Según otra divulgación, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la siguiente fórmula estructural:

30



y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable para su uso como medicamento, preferentemente en el tratamiento de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales, que incluyen opcionalmente neoplasias malignas y metástasis. Preferentemente, dichas enfermedades tumorales son tumores sólidos, preferentemente tumores epiteliales; tales como carcinoma de próstata; carcinoma mamario; carcinoma pancreático; carcinoma de pulmón; carcinoma del tracto gastrointestinal, tal como carcinoma de colon; cáncer de riñón; carcinoma de tiroides; carcinoma uterino; o carcinoma suprarrenal.

35

Según otra divulgación, dicho tumor epitelial es carcinoma de próstata. En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con receptores de andrógenos mutados o truncados. De esta manera, el cáncer de próstata que se puede tratar según la invención puede ser o haberse vuelto resistente a la terapia dirigida antiandrogénica, tal como la enzalutamida.

Según otra divulgación, los tumores epiteliales son carcinoma pancreático, preferentemente carcinoma pancreático exocrino.

10 Según otra divulgación, los tumores epiteliales son carcinoma mamario, preferentemente cáncer de mama triple negativo (TNBC). En una realización, el carcinoma mamario es cáncer de mama triple negativo y el sujeto está en recaída o no responde a la terapia convencional.

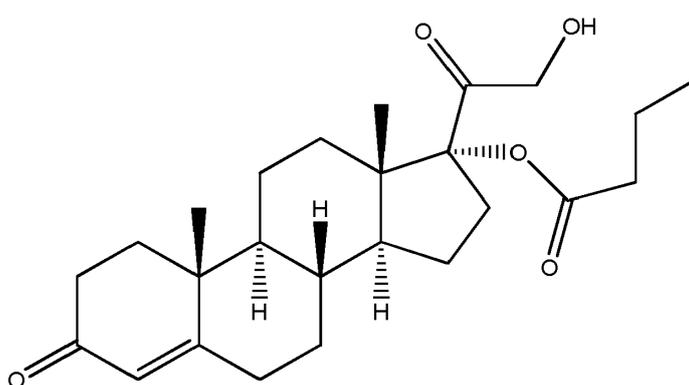
Según otra divulgación, los tumores epiteliales son carcinoma del tracto gastrointestinal, tal como carcinoma de colon.

15

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

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

20

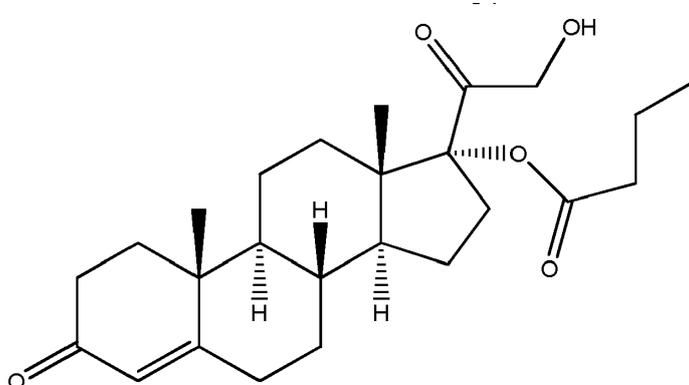


y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable para su uso como un modulador del receptor de glucocorticoides (GR), preferentemente un antagonista de glucocorticoides.

25

En otra divulgación, se proporciona un procedimiento de tratamiento de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la siguiente fórmula estructural:

30



o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto a dicho sujeto.

Según una divulgación, las enfermedades tumorales son neoplasias malignas o metástasis.

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

5 Según una divulgación, las enfermedades tumorales son tumores sólidos. Opcionalmente, los tumores sólidos son tumores epiteliales. Los tumores epiteliales se pueden seleccionar de entre carcinoma de próstata, carcinoma mamario, carcinoma uterino, carcinoma pancreático, carcinoma de pulmón, carcinoma del tracto gastrointestinal (preferentemente carcinoma de colon), cáncer de riñón, carcinoma de tiroides, carcinoma uterino y carcinoma suprarrenal y similares.

10

Según otra divulgación, los tumores epiteliales son carcinoma de próstata, carcinoma pancreático, carcinoma pancreático exocrino o carcinoma mamario.

15 Según otra realización, dicho tumor epitelial es carcinoma de próstata. En una realización preferida de la invención descrita en esta invención, las enfermedades tumorales son cáncer de próstata con receptores de andrógenos mutados o truncados. De esta manera, el cáncer de próstata que se puede tratar según la invención puede ser o haberse vuelto resistente a la terapia dirigida antiandrogénica, tal como la enzalutamida.

20 Según otra divulgación, los tumores epiteliales son carcinoma pancreático, preferentemente carcinoma pancreático exocrino.

Según otra divulgación, donde el carcinoma mamario es cáncer de mama triple negativo. En una realización, el carcinoma mamario es cáncer de mama triple negativo y el sujeto está en recaída o no responde a la terapia convencional.

25

Según otra realización, los tumores epiteliales son carcinoma del tracto gastrointestinal, tal como carcinoma de colon.

30 Según otro aspecto de la invención, se describe un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por glucocorticoides, en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de  $17\alpha$ -valerato de cortexolona o una composición farmacéutica que comprende  $17\alpha$ -valerato de cortexolona.

En los siguientes ejemplos, el compuesto CB-03-06 es el compuesto según la invención, los otros compuestos son ejemplos de referencia.

35

## EJEMPLOS

### **Ejemplo 1: actividad antitumoral *in vitro* de $17\alpha$ -benzoato de cortexolona (CB-03-06) sobre líneas celulares de cáncer de próstata**

40

El experimento se realizó para probar y definir la actividad antitumoral *in vitro* de  $17\alpha$ -benzoato de cortexolona sobre LNCaP (AR<sup>+</sup>) y PC3 (AR<sup>-</sup>), representativas de líneas celulares de cáncer de próstata con expresión positiva o negativa del receptor de andrógenos, respectivamente. El procedimiento experimental consistió en:

- 45
1. Se sembraron 3000 células cancerosas en placas de fondo plano de 96 pocillos en medios completos que contenían un 2 % de suero bovino tratado con carbón vegetal.
  2. Después de 24 horas, se añadió DHT (dihidrotestosterona) 10 nM con o sin compuestos antiandrogénicos, o vehículo DMSO (control negativo) a los cultivos.
  3. Después de 3 días, se cuantificaron los números de células viables usando un ensayo de proliferación
- 50 dependiente de ATP.

El objetivo de la prueba fue determinar la concentración a la que cada compuesto destruye el 50 % de las células cancerosas (CI<sub>50</sub>) en vista de una posible aplicación del compuesto en un ensayo en animales *in vivo*.

55 Los datos del experimento 1 se ajustaron a través de curvas de respuesta a la dosis sigmoideas y se analizaron usando el software de análisis estadístico Prism. Los datos del experimento 2 se analizaron usando el ajuste de la curva de mínimos cuadrados de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism. El valor de CI<sub>50</sub> encontrado para cada línea se notifica en la siguiente tabla, en comparación con los comparadores bien conocidos actualmente usados en el tratamiento del cáncer de próstata: el esteroide antiandrogénico más potente, el acetato de ciproterona

60 (CPA) y la enzalutamida, un inhibidor oral del receptor de andrógenos capaz de prolongar la supervivencia en hombres

con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración. Los resultados de 2 conjuntos de experimentos son los siguientes.

### Experimento 1

5

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

Líneas celulares tumorales	CB-03-06 [17 $\alpha$ -Benzoato de cortexolona]	Acetato de ciproterona	Enzalutamida
LNCaP	12	29	40
PC 3	29	98	208

### Experimento 2

10

Los resultados a continuación incluyen experimentos adicionales a los del experimento 1. Los resultados se analizaron usando el ajuste de la curva de mínimos cuadrados de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism.

Líneas celulares tumorales	CI <sub>50</sub> (microM) de CB-03-06 [17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona]	CI <sub>50</sub> (microM) de acetato de ciproterona CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub> (microM) de enzalutamida
LNCaP	12	22	38
PC3	28	90	180

15 Los valores de CI<sub>50</sub> muestran que la actividad antitumoral de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona, aunque con una tendencia de correlación débil, podría considerarse no estrictamente dependiente de la expresión del receptor de andrógenos, de manera diferente a los comparadores.

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

20

El experimento se realizó para probar y definir la actividad antitumoral *in vitro* de 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona sobre LNCaP (AR<sup>+</sup>) y PC3 (AR<sup>-</sup>), representativas de líneas celulares de cáncer de próstata con expresión positiva o negativa del receptor de andrógenos, respectivamente. El procedimiento experimental consistió en:

25

1. Se sembraron 3000 células cancerosas en placas de fondo plano de 96 pocillos en medios completos que contenían un 2 % de suero bovino tratado con carbón vegetal.
2. Después de 24 horas, se añadió DHT (dihidrotestosterona) 10 nM con o sin compuestos antiandrogénicos, o vehículo DMSO (control negativo) a los cultivos.

30

3. Después de 3 días, se cuantificaron los números de células viables usando un ensayo de proliferación dependiente de ATP.

El objetivo de la prueba fue determinar la concentración a la que cada compuesto destruye el 50 % de las células cancerosas (CI<sub>50</sub>) en vista de una posible aplicación del compuesto en un ensayo en animales *in vivo*.

35

Los datos del experimento 1 se ajustaron a través de curvas de respuesta a la dosis sigmoideas y se analizaron usando el software de análisis estadístico Prism. Los datos del experimento 2 se analizaron usando el ajuste de la curva de mínimos cuadrados de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism. El valor de CI<sub>50</sub> encontrado para cada línea se notifica en la siguiente tabla, en comparación con los comparadores bien conocidos actualmente usados en el tratamiento del cáncer de próstata: el esteroide antiandrogénico más potente, el acetato de ciproterona (CPA) y la enzalutamida, un antagonista oral del receptor de andrógenos capaz de prolongar la supervivencia en hombres con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración. Los resultados de 2 conjuntos de experimentos son los siguientes.

### 45 Experimento 1

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

Líneas tumorales celulares	CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]	Acetato de ciproterona	Enzalutamida
LNCaP	13	29	40
PC 3	55	98	208

### Experimento 2

- 5 Los resultados a continuación incluyen experimentos adicionales a los del experimento 1. Los resultados se analizaron usando el ajuste de la curva de mínimos cuadrados de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism.

Líneas tumorales celulares	CI <sub>50</sub> (microM) de CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]	CI <sub>50</sub> (microM) de acetato de ciproterona	CI <sub>50</sub> (microM) de enzalutamida
LNCaP	10	22	38
PC 3	50	90	180

- 10 Los valores de CI<sub>50</sub> muestran que la actividad antitumoral del 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona (CB-03-10) podría correlacionarse con la expresión del receptor de andrógenos en las líneas celulares.

### **Ejemplo 3: actividad antitumoral *in vitro* de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (CB-03-06) sobre líneas celulares de cáncer de páncreas**

- 15 El experimento se realizó para probar y definir la actividad antitumoral *in vitro* de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona sobre dos líneas celulares de tumor pancreático, Panc1 (AR<sup>+</sup>) y MiaPaca2 (AR bajo), representativas de las células de cáncer de páncreas.
- 20 Las líneas también se clasificaron como positivas (AR<sup>+</sup>) o bajas (AR<sup>+/</sup>)/negativas (AR<sup>-</sup>) para la presencia y expresión del receptor de andrógenos.

El procedimiento experimental consistió en:

- 25 1. Se sembraron 3000 células cancerosas en placas de fondo plano de 96 pocillos en medios completos que contenían un 2 % de suero bovino tratado con carbón vegetal.  
 2. Después de 24 horas, se añadió DHT (dihidrotestosterona) 10 nM con o sin compuestos antiandrogénicos, o vehículo DMSO (control negativo) a los cultivos.  
 3. Después de 3 días, se cuantificaron los números de células viables usando un ensayo de proliferación dependiente de ATP.
- 30

El objetivo de la prueba fue determinar la concentración a la que cada compuesto destruye el 50 % de las células cancerosas (CI<sub>50</sub>) en vista de una posible aplicación del compuesto en un ensayo en animales *in vivo*.

- 35 Los datos del experimento 1 se ajustaron a través de curvas de respuesta a la dosis sigmoideas y se analizaron usando el software de análisis estadístico Prism. Los datos del experimento 2 se analizaron usando el ajuste de la curva de mínimos cuadrados de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prism. El valor de CI<sub>50</sub> encontrado para cada línea se notifica en la siguiente tabla, en comparación con los comparadores bien conocidos actualmente usados en el tratamiento del cáncer de próstata: el esteroide antiandrogénico más potente, el acetato de ciproterona (CPA) y la enzalutamida, un antagonista oral del receptor de andrógenos capaz de prolongar la supervivencia en hombres con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración. Los resultados de 2 conjuntos de experimentos son los siguientes.
- 40

### Experimento 1

- 45 Los resultados se ajustaron mediante curvas de respuesta a la dosis sigmoideas en el software de análisis estadístico

Prizm.

Líneas celulares tumorales	CB-03-06 [17 $\alpha$ -Benzoato de cortexolona]	Acetato de ciproterona	Enzalutamida
Panc1	30	54	156
MiaPaca2	23	46	77

**Experimento 2**

5

Los resultados a continuación incluyen experimentos adicionales a los del experimento 1. Los resultados se analizaron usando el ajuste de la curva de mínimos cuadrados de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prizm.

Líneas celulares tumorales	CI <sub>50</sub> (microM) de CB-03-06 [17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona]	CI <sub>50</sub> (microM) de acetato de ciproterona CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub> (microM) de enzalutamida
Panc1	28	46	111
MiaPaca2	20	39	65

10

Los valores de CI<sub>50</sub> muestran que la actividad antitumoral de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (CB-03-06) es al menos dos veces mayor que la actividad de los comparadores (CPA y Enzalutamida), y que no existe correlación con la expresión del receptor de andrógenos en las líneas celulares. Dado que MiaPaca2 se caracterizan por una baja/nula expresión de AR, la actividad anticancerígena del compuesto no está directamente correlacionada con la expresión del receptor de andrógenos en las líneas celulares cancerosas.

15

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

20

El experimento se realizó para probar y definir la actividad antitumoral *in vitro* de 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona sobre líneas celulares representativas de tumores pancreáticos, en concreto Panc1 (AR<sup>+</sup>) y MiaPaca2 (R bajo), representativas de las células de cáncer de páncreas.

25

Las líneas también se clasificaron como positivas (AR<sup>+</sup>) o bajas (AR<sup>+/-</sup>)/negativas (AR<sup>-</sup>) para la presencia y expresión del receptor de andrógenos.

El procedimiento experimental consistió en:

30

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

35

El objetivo de la prueba fue determinar la concentración a la que cada compuesto destruye el 50 % de las células cancerosas (CI<sub>50</sub>) en vista de una posible aplicación del compuesto en un ensayo en animales *in vivo*.

40

Los datos del experimento 1 se ajustaron a través de curvas de respuesta a la dosis sigmoideas y se analizaron usando el software de análisis estadístico Prizm. Los datos del experimento 2 se analizaron usando el ajuste de la curva de mínimos cuadrados de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prizm.

45

El valor de CI<sub>50</sub> encontrado para cada línea se notifica en la siguiente tabla, en comparación con los comparadores bien conocidos: el esteroide antiandrogénico más potente, el acetato de ciproterona (CPA) y la enzalutamida, un antagonista oral del receptor de andrógenos capaz de prolongar la supervivencia en hombres con cáncer. Los resultados de 2 conjuntos de experimentos son los siguientes.

**Experimento 1**

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

Líneas tumorales celulares	CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]	de Acetato ciproterona	de Enzalutamida
Panc1	66	54	156
MiaPaca2	43	46	77

**Experimento 2**

10

Los resultados a continuación incluyen experimentos adicionales a los del experimento 1. Los resultados se analizaron usando el ajuste de la curva de mínimos cuadrados de regresión no lineal en el software de análisis estadístico Prizm.

Líneas tumorales celulares	CI <sub>50</sub> (microM) de CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]	CI <sub>50</sub> (microM) de acetato de ciproterona	CI <sub>50</sub> (microM) de enzalutamida
Panc1	60	46	111
MiaPaca2	37	39	65

15

Los valores de CI<sub>50</sub> muestran que la actividad antitumoral del 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona no se correlaciona con la expresión del receptor de andrógenos en las líneas celulares.

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

20

La actividad de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona (CB-03-06) sobre el crecimiento tumoral de xenoinjerto pancreático en ratones desnudos se ha evaluado en comparación con el esteroide antiandrogénico más potente acetato de ciproterona (CPA).

25 El 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona y el acetato de ciproterona se diluyeron por separado en DMSO/2-hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina (vehículo).

La prueba se realizó comparando la actividad antitumoral de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona a dos dosis diferentes (8,0 mg/kg, correspondiente aproximadamente a 230  $\mu$ M, y 40 mg/kg, correspondiente aproximadamente a 1150  $\mu$ M),  
30 *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 acetato de ciproterona en dos dosis diferentes (7.4 mg/kg y 37 mg/kg).

Se inyectaron por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células MiaPaca-2 suspendidas en matrigel en ratones desnudos 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 del tumor haya alcanzado los 50 mm<sup>3</sup> después del trasplante. Todos los compuestos fueron inyectados 100  $\mu$ l/ratón de solución de dosis baja (aproximadamente 230  $\mu$ M) o 100  $\mu$ l/ratón de solución de dosis alta (aproximadamente 1150  $\mu$ M) de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona, vehículo y acetato de ciproterona, respectivamente.

40 Los compuestos y los controles se administraron por vía subcutánea diariamente durante 28 días.

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

Los resultados se representan en la figura 1 como cambio promedio en el volumen del tumor en relación con el inicio del tratamiento. El volumen tumoral se calculó según la fórmula  $0,5236(r_1)^2(r_2)$  donde  $r_1 < r_2$ .

45

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

prueba de la t de Student.

Las altas dosis de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona mantuvieron el tamaño del tumor pancreático a menos de 5 veces el tamaño del tumor cuando se inició el tratamiento. En contraste, el tumor promedio en los grupos de vehículo y de tratamiento con acetato de ciproterona aumentó en tamaño a 12 veces. A partir de estos datos, es evidente la actividad antitumoral del compuesto de la presente invención, el 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona.

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

10 La actividad de 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona (CB-03-10) sobre el modelo de xenoinjerto de tumor pancreático en ratones desnudos se ha evaluado en comparación con el esteroide antiandrogénico acetato de ciproterona (CPA).

15 El 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona y el acetato de ciproterona se diluyeron por separado en DMSO/2-hidroxiopropil  $\beta$ -ciclodextrina (vehículo).

La prueba se realizó comparando la actividad antitumoral de 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona a dos dosis diferentes (aproximadamente a 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 acetato de ciproterona en dos dosis diferentes 20 (7.4 mg/kg y 37 mg/kg).

Se inyectaron por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células MiaPaca-2 suspendidas en matrigel en ratones desnudos atímicos de 6 semanas de edad.

25 El tratamiento con el compuesto probado, con el vehículo y con el compuesto comparativo se inició después de que el tumor haya alcanzado un volumen de 50 mm<sup>3</sup> después de la implantación, inyectando por vía subcutánea 100  $\mu$ l/ratón de solución de dosis baja (aproximadamente 230  $\mu$ M) o 100  $\mu$ l/ratón de solución de dosis alta (aproximadamente 1150  $\mu$ M) de 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona, vehículo y acetato de ciproterona, respectivamente. Los compuestos y los controles se administraron por vía subcutánea diariamente durante 28 días. 30 Los tumores se midieron cada 4 días con un calibrador digital.

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

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

El 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona mantuvo el tamaño del tumor pancreático aumentado a menos de 5 veces el tamaño del tumor inicial durante el tiempo del tratamiento. Además, cuando se suspende el tratamiento, el tamaño del tumor tiende a aumentar nuevamente, pero con una tasa y extensión más bajas. En contraste, el tumor promedio en los grupos de vehículo y de tratamiento con acetato de ciproterona aumentó en tamaño a 12 veces y más, lo que provocó la necesidad de suprimir algunos de los animales de estos grupos por razones humanitarias. A partir de estos datos, es evidente la actividad antitumoral del compuesto de la presente invención, el 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona.

45 A partir de los datos de los ejemplos 5 y 6, se confirmó la actividad antitumoral *in vivo* evidente de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona y 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona contra el tumor pancreático, y ambos compuestos resultaron tener una actividad antitumoral mayor que el acetato de ciproterona. en el mismo modelo animal (ver figuras 3 y 4).

#### **50 Ejemplo 7: índice terapéutico *in vitro* en líneas celulares de cáncer de páncreas**

Con el fin de evaluar la seguridad de los compuestos que se probarán en los experimentos de viabilidad de las líneas celulares, se deben tener en cuenta todos los factores que afectan a la supervivencia y la viabilidad celular. En este sentido, la evaluación de la toxicidad intrínseca de compuestos y comparadores es realmente importante. La 55 proporción de CI<sub>50</sub> de los compuestos en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y la CI<sub>50</sub> en las líneas celulares de cáncer constituyen el Índice terapéutico y muestran cuál es el compuesto más seguro para ser probado.

Las CI<sub>50</sub> en CMSP se probaron en 2 estados de activación diferentes:

60 estimulado - células que se dividen activamente

en reposo: células inactivas que no se dividen

Los resultados se presentan en las tablas a continuación, relevantes para, respectivamente, CMSP estimuladas y CMSP en reposo:

#### CI<sub>50</sub> (microM) en CMSP estimuladas

##### Experimento 1

10

Líneas celulares	CB-03-06 [17 $\alpha$ -Benzoato de cortexolona]	CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]	Acetato de ciproterona	Enzalutamida
Panc1	23	68	52	159
MiaPaca2	17	34	39	79
CMSP	113	106	63	52

##### Experimento 2

Líneas celulares	CB-03-06 [17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona] CI <sub>50</sub> (microM)	CB-03-10 [17 $\alpha$ -valerato, 21-propionato de cortexolona] CI <sub>50</sub> (microM)	Acetato de ciproterona CI <sub>50</sub> (microM)	Enzalutamida CI <sub>50</sub> (microM)
Panc1	28	60	46	110
MiaPaca2	20	37	39	65
CMSP	97	94	62	90

15 Paralelamente, se han repetido los mismos experimentos en CMSP en reposo, obteniendo los siguientes resultados a continuación.

#### CI<sub>50</sub> (microM) en CMSP en reposo

20 Experimento 1

Líneas celulares	CB-03-06 [17 $\alpha$ -Benzoato de cortexolona]	CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]	Acetato de ciproterona
Panc1	23	68	52
MiaPaca2	17	34	39
CMSP	100	114	18

##### Experimento 2

Líneas celulares	CB-03-06 [17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona] CI <sub>50</sub> (microM)	CB-03-10 [17 $\alpha$ -valerato, 21-propionato de cortexolona] CI <sub>50</sub> (microM)	Acetato de ciproterona CI <sub>50</sub> (microM)
Panc1	28	60	46
MiaPaca2	20	37	39
CMSP	85	120	84

25

El índice terapéutico (IT) resultante calculado en CMSP estimuladas se presenta en la tabla a continuación:

#### IT en CMSP estimuladas

**Experimento 1**

Líneas celulares	CB-03-06 [17 $\alpha$ -Benzoato de cortexolona]	CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]	Acetato de ciproterona	Enzalutamida
Panc1	5	2	1	0
MiaPaca2	7	3	2	1

**5 Experimento 2**

Líneas celulares	IT de CB-03-06 [17 $\alpha$ -Benzoato de cortexolona]	IT de CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]	IT de Acetato de ciproterona	IT de Enzalutamida
Panc1	3	2	1	1
MiaPaca2	5	3	2	1

El índice terapéutico resultante calculado en CMSP en reposo se presenta en la tabla a continuación:

**10 IT en CMSP en reposo****Experimento 1**

Líneas celulares	CB-03-06 [17 $\alpha$ -Benzoato de cortexolona]	CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]	Acetato de ciproterona
Panc1	4	2	0
MiaPaca2	6	3	0

**15 Experimento 2**

Líneas celulares	IT de CB-03-06 [17 $\alpha$ -Benzoato de cortexolona]	IT de CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]	IT de Acetato de ciproterona
Panc1	3	2	4
MiaPaca2	4	3	1

En las tablas, el valor 0 indica mayor toxicidad en CMSP que en las líneas celulares de cáncer.

**20 Ejemplo 8: actividad antitumoral *in vitro* de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona y 17 $\alpha$ -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 anticancerígena *in vitro* de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona y 17 $\alpha$ -valerato, 21-propionato de cortexolona sobre líneas celulares representativas de tumores epiteliales intestinales, a saber, HT29. El procedimiento del experimento consistió en:

1. Las células monocapa HT-29 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2 x 10<sup>4</sup> células/ml. Las células sembradas se mantuvieron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % y se dejaron unir durante 24 h.
2. Posteriormente, las células se incubaron durante 72 h con los compuestos de prueba a concentraciones, cada una, de 0,16, 0,8, 4, 20, 100 y 500 mM.
3. Después de 72 h de tratamiento, se realizó el ensayo colorimétrico MTT.

El objetivo de la prueba fue determinar la concentración a la que cada compuesto destruye el 50 % de las células cancerosas (C<sub>I50</sub>) en vista de una posible aplicación del compuesto en un ensayo en animales in vivo.

Los datos se ajustaron a través de curvas de respuesta a la dosis sigmoideas y se analizaron usando el software de

análisis estadístico Prism.

El valor de  $CI_{50}$  encontrado para cada línea se presenta en la siguiente tabla.

**5 Inhibición (%) a diferente concentración micromolar para los dos productos en HT29**

Concentraciones micromolares	CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]	CB-03-06 [17 $\alpha$ -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  $CI_{50}$  calculados para los dos productos (presentados a continuación) muestran que ambos compuestos tienen una actividad anticancerígena evidente sobre HT29.

10

**$CI_{50}$  calculada (concentración micromolar)**

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

**15 Ejemplo 9: índice terapéutico *in vitro* en líneas celulares de cáncer intestinal epitelial**

Con el fin de evaluar la seguridad de los compuestos que se probarán en los experimentos de viabilidad de las líneas celulares, se deben tener en cuenta todos los factores que afectan a la supervivencia y la viabilidad celular. En este sentido, la evaluación de la toxicidad intrínseca de compuestos y comparadores es realmente importante. La relación entre  $CI_{50}$  de los compuestos en CMSP y  $CI_{50}$  en líneas celulares de cáncer constituye el índice terapéutico, un parámetro importante para definir la eficacia del producto en condiciones seguras.

20

Las  $CI_{50}$  en CMSP se probaron en 2 estados de activación diferentes:

25 Estimulado - células que se dividen activamente

En reposo: células inactivas que no se dividen

El índice terapéutico (IT) resultante calculado en CMSP estimuladas y en reposo se presenta en la tabla a continuación:

30

**Experimento 1**

Producto	CB-03-06 [17 $\alpha$ -Benzoato de cortexolona]	CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]
Lugar de estimulación	7	3
En reposo	6	3

**Experimento 2**

35

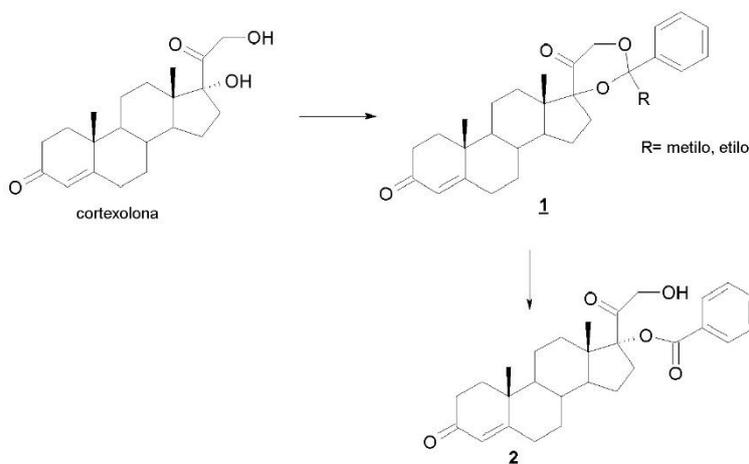
Producto	(IT) de CB-03-06 [17 $\alpha$ -Benzoato de cortexolona]	(IT) de CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]
Lugar de estimulación	6	3

Producto	(IT) de CB-03-06 [17 $\alpha$ -Benzoato de cortexolona]	(IT) de CB-03-10 [17 $\alpha$ -Valerato-21-propionato de cortexolona]
En reposo	5	4

A partir de estos datos, se confirmó la actividad antitumoral y la seguridad del compuesto de la presente invención, 17 $\alpha$ -valerato, 21-propionato de de cortexolona, frente a las células de cáncer epitelial intestinal.

### 5 Ejemplo 10 - Síntesis de 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona

El 17 $\alpha$ -benzoato de cortexolona se preparó según un esquema de síntesis que incluye las siguientes etapas:



10

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

15 Después de la eliminación del disolvente y la cristalización en disolvente alcohólico, se obtuvo ortobenzoato de cortexolona **1** como un sólido.

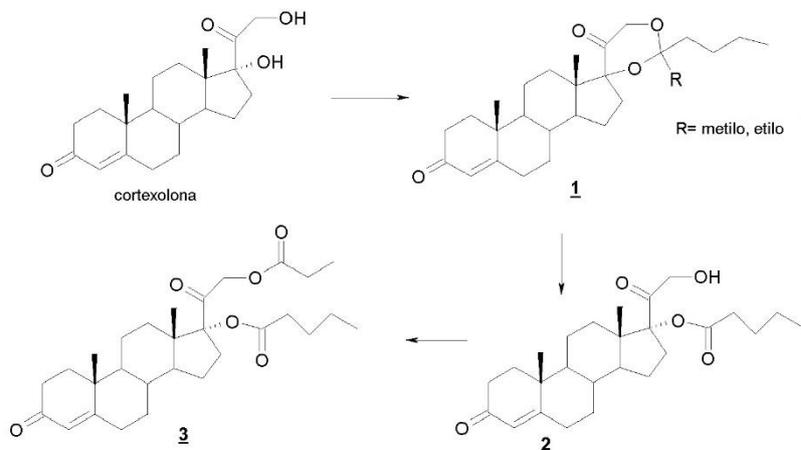
En la etapa 2, ortobenzoato de cortexolona **1** (R = metilo o R= etilo) se disolvió en un disolvente alcohólico (por ejemplo, metanol) y se trató con tampón acético 0,1 N a reflujo. Después de la eliminación del disolvente, el residuo se purificó por tratamiento con agua desmineralizada y se recuperó el 17- $\alpha$ -benzoato de cortexolona como un sólido.

20

### Ejemplo 11 - Síntesis de 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona

El 17 $\alpha$ -valerato-21-propionato de cortexolona se preparó según el siguiente esquema sintético:

25



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

En la etapa 2, ortovalerato de cortisolona 1 (R = metilo o R= etilo) se disolvió en un disolvente alcohólico (por ejemplo, metanol) y se trató con tampón acético 0,1 N (pH 3 a 3,9) a reflujo. Después de la eliminación del disolvente seguido de un tratamiento con agua purificada, se recuperó 17 $\alpha$ -valerato de cortisolona 2 como un sólido.

En la etapa 3, se disolvió 17 $\alpha$ -valerato de cortisolona 2 en piridina y se añadió 1 equivalente de cloruro de propionilo. Cuando se completó la conversión, la mezcla se diluyó con agua, y el producto 3 se recuperó como un sólido y se purificó por cristalización con alcoholes.

#### **Ejemplo 12 - Análisis de la actividad anticancerígena *in vitro* de compuestos derivados de cortisolona, en particular CB-03-06**

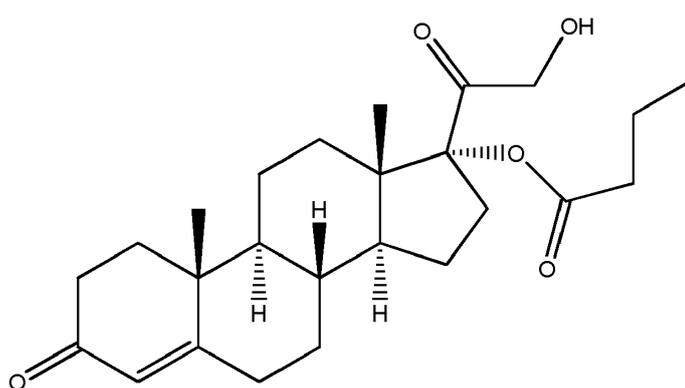
Se probó la capacidad de una serie de compuestos derivados de cortisolona, en particular CB-03-06, para inhibir el crecimiento de líneas celulares de cáncer establecidas *in vitro*.

Se sembraron líneas celulares de cáncer a 3000 células en placas de fondo plano de 96 pocillos en medios completos que contenían un 2 % de suero bovino tratado con carbón vegetal. Después de 24 horas, se añadieron los compuestos de prueba o DMSO/vehículo (concentración final al 0,1 % como control negativo). El acetato de ciproterona (CPA) y la enzalutamida, dos potentes antiandrógenos reconocidos, se usaron como control positivo para la citotoxicidad celular. Después de 3 días, se cuantificaron los números de células viables usando un ensayo de viabilidad celular dependiente de ATP (Promega Cell Titer Glo). La figura 5 muestra una titulación de dosis de la actividad de citotoxicidad de compuestos derivados de cortisolona en líneas celulares de próstata y de páncreas humanas. La determinación de la concentración a la que cada compuesto destruye el 50 % de las células cancerosas (CI<sub>50</sub>) se realizó para expresar la capacidad de CB-03-06 y otros compuestos para inhibir el crecimiento de células cancerosas. Cada compuesto se tituló de 3  $\mu$ M a 200  $\mu$ M. Después de 3 días, se cuantificaron los números de células viables usando un ensayo de proliferación dependiente de ATP.

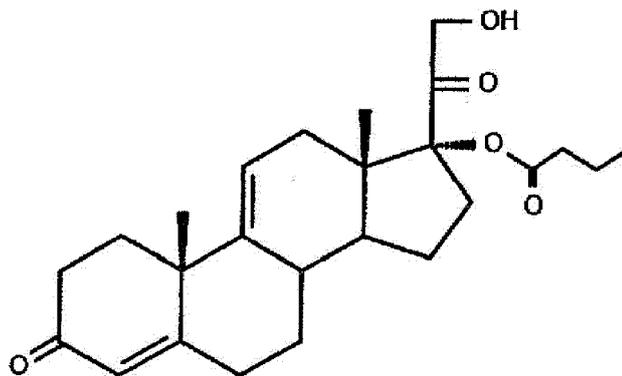
Los datos mostrados en la tabla I se ajustaron a través de curvas de respuesta a la dosis sigmoideas y se analizaron usando el estadístico Prism.

Tipo de tejido	Nombre de la línea celular	CB-03-01 C17 prop	CB-03-03 C17,21 but	CB-03-04 9dehy 17 but	CB-03-05 C17 val	CB-03-06 C17 ben	CB-03-10 C17,21 val	Enza lutamida	CPA
Cáncer de próstata	LNCaP	33	16	46	32	12	10	38	22
	PC3	190	53	140	170	28	53	180	90
Cáncer de páncreas	Panc1	490	70	340	74	28	60	110	46
	MiaPaca2	110	30	160	59	20	37	65	39

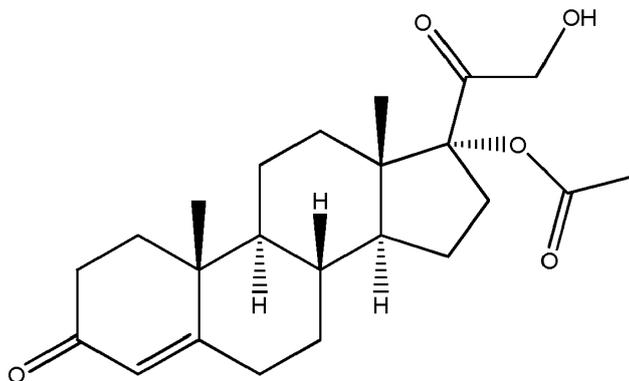
Tabla I.  $IC_{50}$  de compuestos derivados de cortexolona probados *in vitro* en líneas celulares de cáncer de próstata y de páncreas



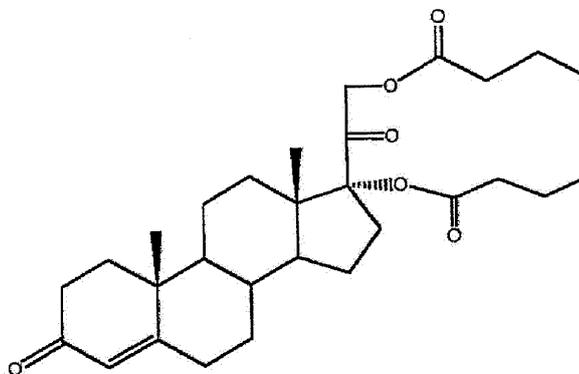
CB-03-05



CB-03-04



CB-03-01



CB-03-03

5 Está claro a partir de los datos mostrados en la figura 5 y en la tabla I que los compuestos derivados de cortisona destruyen células cancerosas a diversas concentraciones y  $CI_{50}$ . CB-03-06 destruye las células de cáncer de próstata (panel a) mejor que el potente antiandrógeno CPA. Más importante aún, inhiben el crecimiento *in vitro* de las células de cáncer de próstata mejor que Enzalutamida (panel b), un fármaco antiandrogénico novedoso y potente usado actualmente en clínica como la primera opción para los cánceres de próstata dependientes de andrógenos.

10

Curiosamente, CB-03-06 inhibe el crecimiento de líneas celulares pancreáticas (panel b) que se sabe que expresan el receptor de andrógenos a niveles muy bajos. Estos datos sugieren un mecanismo de acción independiente relacionado con la citotoxicidad en lugar de la actividad antiandrogénica.

### 15 Ejemplo 13 - Análisis de la expresión de receptores de andrógenos (AR) en líneas celulares de cáncer probadas

Se realizó un ensayo FACS en líneas celulares de próstata y pancreáticas probadas en la tabla I para comprender mejor la relación entre la expresión de AR en líneas celulares de cáncer y la capacidad de los compuestos derivados de cortisona CB-03-06 para inhibir el crecimiento de células cancerosas.

20

La figura 6 muestra el nivel de expresión de AR en las células cancerosas probadas. Como era de esperar, el análisis FACS de la expresión de AR en las líneas celulares de próstata y pancreáticas es consistente con los niveles de expresión publicados: LNCaP > Panc1 > PC3 = MiaPaca2.

25 Para aclarar mejor la correlación entre AR y  $CI_{50}$ , se implementó la tabla I con la adición de los niveles de expresión de AR de las líneas celulares de cáncer probadas (tabla II)

Nombre de la línea celular	CB-03-01	CB-03-03	CB-03-04	CB-03-05	CB-03-06	CB-03-10	Enza	CPA	Expresión de AR
	C17 prop	C17,21 but	9deshi 17 but	C17 val	C17 ben	C17,21 val	lutamida		
LNCaP	33	16	46	32	12	10	38	22	9
PC3	190	53	140	170	28	53	180	90	1
Pane1	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 de próstata y de páncreas y  $CI_{50}$  de compuestos derivados de cortexolona

- 5 Como se esperaba, la inhibición del crecimiento mostrada por los potentes antiandrógenos CPA y enzalutamida se correlaciona con la expresión de AR en líneas celulares de cáncer de próstata. Las actividades inhibitoras de CB-03-06 también se correlacionan (menos estrictamente) con la expresión de AR en células de cáncer de próstata. Sin embargo, existe una correlación inversa entre la expresión de AR y las actividades inhibitoras en las células de cáncer de páncreas. Todos los compuestos probados fueron más activos en las MiaPaca2 que expresan AR bajo ( $AR^{-/-}$ ) en comparación con las células Panc1 ( $AR^{+}$ ). Este resultado sugiere un posible mecanismo de acción independiente de AR en el cáncer de páncreas. CB-03-06 es el compuesto más potente de la serie. Es de destacar que CB-03-06 es mejor que CPA en las 4 líneas celulares de cáncer probadas. CB-03-06 también es más potente que enzalutamida en las líneas celulares de cáncer de próstata.

15 **Ejemplo 14 - Análisis de la actividad anticancerígena *in vitro* de compuestos derivados de cortexolona, en particular CB-03-06 en una muestra más grande de líneas celulares de cáncer derivadas de tumores sólidos**

- Dado que la actividad citotóxica de CB-03-06 parece ser independiente de la expresión de AR, se probó una muestra más grande de tumores sólidos. MCF7, una línea celular de cáncer de mama ( $AR^{+/-}$ ), una línea celular pancreática adicional con una mayor expresión de AR (BxPC3) y una línea celular de cáncer intestinal (HT29) se añadieron al panel anterior. Los resultados se representan en la tabla III.

proliferación <i>in vitro</i> IC50 (µM)					Genotipo	
Tipo de tejido	Nombre de línea celular	CB-03-05 C17 val	CB-03-06 C17 ben	Enza lutamida	Expresión de proteína AR relativa	Expresión de proteína GR relativa a LNCaP
Cáncer de próstata	LNCaP	32	12	38	9	1
	PC3	170	28	180	1	2
	22Rv1		25		positivo según bibliografía	negativo según bibliografía
Cáncer de páncreas	Panc1	74	28	110	4	positivo según bibliografía
	MiaPaca2	59	20	65	1	4
	BxPC3		28	127	3	positivo según bibliografía
Cáncer de mama	MCF7	50	25	129	1	2
	MDA-MB-231	inactiva	46	200	1	5
Cáncer de colon	HT29	35	13		positivo según bibliografía	positivo según bibliografía
Linfocito sano	PMBC EN REPOSO	120	85		nd	positivo según bibliografía
	PMBC ESTIMULADAS	130	97	90	nd	positivo según bibliografía

Tabla III. IC50 de compuestos derivados de cortexolona en líneas celulares cancerosas caracterizadas por expresión AR

5 CB-03-06 inhibe fuertemente la viabilidad celular de múltiples líneas celulares de cáncer de diferente origen epitelial. La actividad de citotoxicidad del compuesto no se correlaciona con la expresión del receptor de andrógenos. Tampoco se correlaciona con la expresión de tipo silvestre (WT). Además, CB-03-06 es más potente que la enzalutamida en todas las líneas celulares de cáncer probadas.

**Ejemplo 15 - Índice terapéutico de compuestos derivados de cortexolona en diferentes líneas celulares de cáncer**

10

El índice terapéutico (IT) (también denominado ventana terapéutica, ventana de seguridad o relación terapéutica) es una comparación de la cantidad de un agente terapéutico que causa el efecto terapéutico con la cantidad que causa toxicidad. La CI<sub>50</sub> de los compuestos se determinó en células frescas aisladas a partir de sangre humana (CMSP). La toxicidad del compuesto se determinó de la siguiente manera:

15

$$\text{Índice terapéutico} = \text{Seguridad/Potencia} = \text{CMSP estimulado con IC}_{50}/\text{célula de cáncer IC}_{50}$$

Los resultados se muestran en la tabla IV.

Proliferación <i>in vitro</i> IC50 (micro Molar)									
Tejido	Nombre de línea celular	CB-03-01	CB-03-03	CB-03-04	CB-03-05	CB-03-06	CB-03-10	Enza	CPA
Tipo		C17 prop	C17,21 but	9dehy 17 but	C17 val	C17 ben	C17,21 val	lutamida	
Cáncer de próstata	LNCaP	33	16	46	32	12	10	38	22
	PC3	190	53	140	170	28	53	180	90
Cancer de páncreas	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	35	16	34		
Linfocito sano	PBMC ESTIMULADAS	0.1	140	360	130	97	94	90	62
<b>Índice terapéutico = PBMC en reposo con IC50/célula de cáncer IC50</b>									
Tejido	Nombre de línea celular	CB-03-01	CB-03-03	CB-03-04	CB-03-05	CB-03-06	CB-03-10	Enza	CPA
Tipo		C17 prop	C17,21 but	9dehy 17 but	C17 val	C17 ben	C17,21 val	lutamida	
Cáncer de próstata	LNCaP	0	9	8	4	8	9	2	3
	PC3	0	3	3	1	3	2	1	1
Cancer de páncreas	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 Estim	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla IV. Índice terapéutico de compuestos derivados de cortexolona en un panel de diferentes líneas celulares de cáncer

5

Todos los compuestos derivados de cortexolona muestran un perfil de seguridad robusto. CB-03-06 tiene el índice terapéutico más alto. Esto revela que CB-03-06 tiene un perfil más seguro en comparación con CPA y enzalutamida.

**Ejemplo 16 - Afinidad de unión de CB-03-06 por el receptor de andrógenos**

Los experimentos anteriores demostraron una fuerte actividad de citotoxicidad de CB-03-06 en líneas celulares de  
 5 cáncer derivadas de tumores de diferentes orígenes. Esta actividad citotóxica no se correlaciona completamente con la anti-expresión del receptor de andrógenos en las células cancerosas analizadas.

Con base en esta evidencia, se diseñaron ensayos para evaluar la afinidad del compuesto con el receptor de andrógenos (AR). Para determinar las afinidades de unión relativas de CB-03-06 al AR de tipo silvestre, se usó un  
 10 ensayo de competencia usando el kit Polar Screen de Life Technologies. En resumen, el AR se añade a un ligando de andrógeno fluorescente (Fluormone™ AL Green) para formar un complejo AR-LBD. Los competidores desplazan el ligando fluorescente Fluormone™ AL Green del AR-LBD, lo que hace que el ligando fluorescente caiga rápidamente durante su vida útil de fluorescencia, lo que da como resultado un bajo valor de polarización. Los no competidores no desplazarán el ligando fluorescente del complejo, por lo que el valor de polarización permanece alto. El cambio en el  
 15 valor de polarización en presencia de compuestos de prueba se usa para determinar la afinidad relativa de los compuestos de prueba por AR-LBD.

La afinidad de CB03-06 por el receptor de AR fue 2,6E-06 (CI50 molar). Dentro del mismo ensayo, la afinidad de la dihidrotestosterona (un potente aglutinante del receptor de AR) fue 1,1E-08, la afinidad de unión de CB-03-06 por el  
 20 receptor de AR en comparación con DHT es baja y caracteriza a CB-03-06 como un posible aglutinante de AR.

**Ejemplo 17 - Actividad transcripcional de CB-03-06 en el receptor de glucocorticoides**

Las hormonas andrógenas y glucocorticoides provocan efectos divergentes y a menudo opuestos en células, tejidos  
 25 y animales. Una amplia gama de evidencia biológica fisiológica y molecular sugiere que los receptores que median estos efectos, los receptores de andrógenos y glucocorticoides (AR y GR, respectivamente), influyen en la actividad transcripcional de cada uno. Las actividades antagonistas y agonistas de GR de CB-03-06 se probaron en un ensayo *in vitro*. En resumen, las células epiteliales de riñón humano se transfectaron con una construcción de ADN que contenía sitios de unión a GR enlazada a una molécula informadora basada en luminiscencia. Después de 24 horas,  
 30 las células se trataron en modo antagonista o agonista. Después de 24 horas adicionales, se cuantificó la luminiscencia que es proporcional a la actividad transcripcional agonista de GR.

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

35 La actividad antagonista de CB-03-06 se comparó con un antagonista de GR conocido,

Mifepristona (también llamada RU486) como se muestra en la figura 7.

Ensayo agonista - se basó en la inducción de luminiscencia por CB-03-06

40

La actividad agonista de CB-03-06 se comparó con una RU486 que se sabe que no tiene actividad agonista. Como se muestra en la figura 8,

Como se muestra en la figura 7, CB-03-06 no es un antagonista muy potente (100 veces menos que RU486). Por el  
 45 contrario, CB-03-06 es un potente agonista de GR a la concentración de 1,4E-08 M que activa el GR en la misma medida que Dex 4,6E-09 M. CB-03-06 no es tan potente como Dex ya que su actividad se estabiliza al 45 % del máximo de Dex. En conclusión, CB-03-06 es un antagonista de GR débil y un buen agonista de GR.

**Ejemplo 18 - inducción de apoptosis y detención del ciclo celular por CB-03-06**

50

Se ha demostrado que la mayoría de los fármacos anticancerosos citotóxicos en uso actual inducen la apoptosis en células susceptibles. El hecho de que agentes dispares, que interactúan con diferentes dianas, inducen 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-03-06 se evaluó para determinar si el mecanismo de  
 55 citotoxicidad en las líneas celulares de cáncer estaba mediado por la apoptosis y la detención del ciclo celular.

Las líneas celulares de cáncer se sembraron en placas de fondo plano de 6 pocillos. Después de 24 horas, se añadieron los compuestos de prueba o DMSO vehículo (control negativo). Después de 24 horas adicionales, las células se rasparon y se tiñeron con anexina V conjugada con fluoresceína y yoduro de propidio, y se analizaron por  
 60 citometría de flujo.

La figura 9 muestra claramente cómo CB-03-06 es capaz de inducir apoptosis en la línea celular de cáncer de páncreas MiaPaca2. CB-03-06 induce apoptosis en un total del 56 % de células (apoptosis temprana y tardía) frente a solo el 12 % por el control.

5

La apoptosis puede producirse en la transición G1/S o G2/M del ciclo celular. Las células se trataron con CB-03-10 durante 24 horas, luego se fijaron con paraformaldehído y se tiñeron con yoduro de propidio. Los datos en la figura 10 indican que CB-03-06 induce un bloqueo de fase S a concentraciones más bajas y después un bloqueo de G2/M a mayor concentración. La falta de bloqueo de G1 indica que no hay efecto sobre p53. Los bloqueos de S & G2/M pueden indicar actividad sobre las moléculas del punto de control del ciclo celular. Para la fase S, una posible diana es la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2). Gemzar y cisplatino son ejemplos de fármacos que actúan en fase S. Para G2, una posible diana es CDK1.

10

### Ejemplo 19 - Análisis de la inducción de caspasa por CB-03-06

15

A partir de estudios previos, se determinó que CB-03-06 induce apoptosis usando tinción de anexina V en células MiaPaca2. Para analizar mejor el fenómeno, se midió 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).

20 Para este propósito, se sembraron células MiaPaca2 en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos.

Después de 24 horas, se añadieron compuestos de prueba a las células. La gemcitabina (un conocido agente quimioterapéutico para el cáncer de páncreas) y el DMSO se usaron como controles positivo y negativo, respectivamente. Hubo tres puntos temporales de incubación: 8 horas, 24 horas y 48 horas. Después de cada punto temporal, las células se lisaron en un tampón multiplex que contenía el sustrato de caspasa 3/7 combinado con reactivos de caspasa 8 o caspasa 9, que contienen luciferasa estable en tampones patentados. Los lisados se transfirieron a placas blancas opacas de 96 pocillos antes de medir la luminiscencia en un instrumento Tecan Safire. Se usaron placas paralelas tratadas de forma idéntica para determinar la viabilidad celular. Todas las actividades de caspasa fueron corregidas por el número de células viables. Los resultados se muestran en la figura 11.

25

30 Las actividades de las caspasas 8 y 9 (paneles A y B) fueron inducidas por CB-03-06. Esta inducción fue rápida, relacionada con la dosis y ya evidente después de 8 horas y fue tan alta como un aumento de 7 veces en comparación con el control.

35 La gemcitabina (un conocido agente de quimioterapia usado para el tratamiento del cáncer de páncreas) también indujo actividades de caspasa 8 y 9, pero con una respuesta tardía y menos potente en comparación con CB-03-06. El aumento de 2, 3 veces en la actividad de caspasa 8 y 9 no se ve hasta las 48 horas.

40 **[0251]** Caspasa 3/7 (panel C) fueron inducidas por CB-03-06 a un nivel alto después de 48 horas de incubación. Curiosamente, CB-03-05 no muestra un buen perfil para la activación de caspasa

El mismo ensayo se repitió usando líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP. Para este ensayo, el control positivo es enzalutamida, un potente y novedoso antiandrógeno actualmente usado en clínica para tratar a pacientes con cáncer de próstata. Los resultados se muestran en la figura 12 después de 24 horas de incubación cuando las actividades de caspasa alcanzaron su punto máximo.

45

La figura 12 muestra claramente que CB-03-06 indujo actividades Iniciadora (8 y 9) y efectora (3/7) de caspasa mejor que enzalutamida (control positivo).

50 Estos resultados mostraron una fuerte inducción por CB-03-06 de la actividad de las caspasas en las líneas celulares de cáncer de próstata, afectando a las rutas intrínsecas y extrínsecas, confirmando la inhibición observada en las líneas celulares MiaPaca2.

### Ejemplo 20 - Metabolismo *in vitro* de CB-03-06 en plasma de rata y humano

55

Para obtener una idea del metabolismo de CB-03-06 en plasma humano y de rata, se diseñó un ensayo específico. En resumen, el compuesto se incubó en diferentes puntos temporales en plasma humano y de rata a 37C. Después de la incubación, las muestras se probaron para determinar la presencia del compuesto intacto por cromatografía líquida. La evolución temporal y la concentración se muestran en la figura 13.

60

Los resultados muestran que CB-03-06 mantiene más del 90 % de la concentración inicial durante 8 horas en plasma y se degrada más rápido en rata en comparación con el plasma humano.

#### Ejemplo 21 - Análisis de la farmacocinética *in vivo* de CB-03-06 en un modelo animal (ratón)

5

La farmacocinética de CB-03-06 se evaluó en plasma de ratones después de administración intravenosa (iv), subcutánea (SC) y oral (PO).

Se administraron ratones (3 por grupo) con las siguientes dosis y se extrajo sangre en los momentos indicados. Las muestras de plasma fueron analizadas por HPLC-MS/MS.

10

Grupo	Vía de dosificación	Punto temporal de extracción de sangre
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

La exposición corporal real a CB-03-06 (como lo refleja el AUC) es la más alta después de la administración subcutánea (1620 hora\*ng/ml), hasta un 50 % cuando se administra por vía intravenosa (896) y hasta un 17 % cuando se administra por vía oral (276).

15

#### Ejemplo 22 - Prueba *in vivo* de CB-03-06 en un modelo de xenoinjerto en ratón de cáncer de páncreas humano (línea celular MiaPaca2)

A partir de estudios previos se observó que CB-03-06 inhibe fuertemente el crecimiento *in vitro* de las líneas de células pancreáticas MiaPaca2 (AR<sup>+/+</sup>). Se realizó una investigación sobre si este resultado podría traducirse en un modelo de cáncer de páncreas de xenoinjerto *in vivo*. Se usó como control el acetato de ciproterona (CPA), un anti-andrógeno bien conocido. En resumen, se inyectaron por vía subcutánea (sc)  $1 \times 10^6$  células MiaPaca2 suspendidas en matrigel en ratones desnudos atímicos macho de 6 semanas de edad. Los tumores se midieron cada 4 días con un calibrador digital. El volumen del tumor se calculó según la fórmula:  $0,5236(r1)2(r2)$  donde  $r1 < r2$ . El tratamiento con CB-03-06 y los compuestos de control se iniciaron después de que el tumor había alcanzado los 50 mm<sup>3</sup>. Se inyectaron compuestos diluidos en DMSO/2-hidroxipropil b-ciclodextrina (vehículo) por vía subcutánea diariamente (100 microl/ratón) a la concentración de 40 mg/Kg diariamente durante 28 días consecutivos. La figura 15 muestra el aumento promedio del tumor en el modelo de xenoinjerto *in vivo* después de la inyección sc de CB-03-06 en comparación con el vehículo

30

En la figura 15, CB-03-06 muestra una actividad anti-tumor pancreático *in vivo* significativa en comparación con los controles. También muestra una actividad antitumoral significativa ( $p < 0,5$ ) en comparación con el vehículo solamente o CPA (no se muestra).

35

Durante el período de tratamiento, CB-03-06 mantuvo el tamaño del tumor pancreático en menos de 5 veces en relación con el tamaño inicial. En contraste, el tumor promedio en los grupos de vehículo o de tratamiento con CPA aumentó en tamaño a 12 veces. CB-03-06 no solo muestra que inhibe el crecimiento del tumor, sino que también muestra un beneficio en la supervivencia de los ratones. La mediana de supervivencia fue de 70 días para ratones tratados con CB-03-06 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 mayor en el grupo tratado con vehículo.

40

#### Ejemplo 23 - Prueba *in vivo* de CB-03-06 administrado por vía oral en un modelo de cáncer de próstata humano de xenoinjerto en ratón (células LNCaP)

45

A partir de estudios previos, se observó que CB-03-06 también es eficaz para inhibir *in vitro* el crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP. Se realizó una investigación sobre si este resultado podría traducirse en un modelo de cáncer de próstata de xenoinjerto *in vivo*. Se inyectaron por vía subcutánea  $3 \times 10^6$  células LNCaP suspendidas en matrigel (en el flanco derecho) en ratones desnudos atímicos macho de 6 semanas de edad. Los

tumores se midieron como se describió anteriormente. El tratamiento con CB-03-06 y los compuestos de control se inició después de que el tumor había alcanzado los 50 mm<sup>3</sup>. Las formulaciones para la dosificación se prepararon en 15 % de vitamina E-TPGS y 65 % de una solución al 0,5 % p/v de CMC en tampón de citrato 20 mM (pH 4). La dosificación oral fue diaria (100 mg/Kg en 200 microl/ratón) durante 28 días consecutivos. Los resultados se representaron como cambio promedio en el volumen del tumor en relación con el inicio del tratamiento. La figura 16 muestra los resultados obtenidos del modelo de cáncer de próstata de xenoinjerto *in vivo* después de la administración oral de CB-03-06. La enzalutamida es un anti-andrógeno novedoso y potente, y sirve como control positivo.

La tendencia para el CB-03-06 en dosis oral muestra una fuerte actividad antitumoral contra el cáncer de próstata. La actividad inhibitoria es casi idéntica a la de enzalutamida, que es el medicamento usado actualmente para el tratamiento del cáncer de próstata dependiente de andrógenos en seres humanos.

#### **Ejemplo 24 - Inhibición por CB-03-06 de la secreción *in vitro* de antígeno prostático específico (PSA) de células de cáncer de próstata LNCaP**

El antígeno prostático específico, o PSA, es una proteína producida por las células de la glándula prostática. La prueba de PSA mide el nivel de PSA en la sangre de un hombre. El nivel sanguíneo de PSA a menudo se eleva en hombres con cáncer de próstata y se usa como marcador sustituto para evaluar la progresión del cáncer de próstata en la población humana. Después de la observación de que CB-03-06 fue capaz de inhibir el crecimiento *in vivo* del cáncer de próstata, se determinó la capacidad del compuesto para inhibir la secreción *in vitro* de PSA a partir de las células cancerosas. Las células LNCaP se sembraron en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos en medios que contenían 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 control negativo del vehículo y Enzalutamida como control positivo. Después de 48 horas de incubación con los compuestos de prueba, se recogieron los sobrenadantes y se probaron con un ensayo de Elisa para PSA y se lisaron las mismas células para evaluar la viabilidad celular.

Como se esperaba, el anti-andrógeno puro, enzalutamida, es potente para inhibir la secreción de PSA con una CI<sub>50</sub> < 3 μM. CB-03-06 también es un potente inhibidor de PSA (CI<sub>50</sub> 4 μM). Sin embargo, la actividad de enzalutamida no se tituló tan bien como CB-03-06. Es de destacar que cortexolona, el metabolito principal y final de todos los compuestos de los inventores, es esencialmente inactivo en la secreción de PSA (CI<sub>50</sub> 612 μM). Cuando se probó la viabilidad celular de estas células, enzalutamida tenía una CI<sub>50</sub> de 61 μM y CB-03-06 mostró una CI<sub>50</sub> de 12. Esto confirma la fuerte actividad inhibitoria del crecimiento de ambos compuestos. Es importante destacar que la cortexolona inhibe la viabilidad de LNCaP solo a una concentración muy alta (CI<sub>50</sub> 153 μM) y puede definirse como inactiva como compuesto citotóxico para líneas celulares de cáncer.

#### **Ejemplo 25 - Análisis de la actividad anticancerígena *in vitro* de CB-03-06 en líneas celulares de cáncer de mama**

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) representa aproximadamente el 20 % del cáncer de mama invasivo recién diagnosticado. Este cáncer no está respaldado por las hormonas estrógeno y progesterona, ni por la presencia de demasiados receptores HER2, por esta razón las pacientes no responden a la terapia convencional (por ejemplo, tamoxifeno o Herceptin). En consecuencia, el TNBC se caracteriza por ser resistente a la quimioterapia y tiene baja supervivencia.

Existe una correlación entre esta resistencia al cáncer y la alta expresión de GR (Cancer therapy 2013). Hay ensayos clínicos que prueban un antagonista de GR (Mifepristona/RU486) en combinación con quimioterapia para el tratamiento de TNBC. Sin embargo, el uso clínico de la mifepristona está comprometido debido a la farmacología relacionada con el antagonismo del receptor de progesterona (PR). Para evaluar si CB-03-06 se puede usar como tratamiento potencial para el cáncer de mama, y en particular TNBC, se realizaron ensayos citotóxicos usando líneas celulares de cáncer de mama caracterizadas por diversas expresiones de receptores hormonales

Las líneas celulares de cáncer de mama seleccionadas fueron:

células de cáncer de mama MCF7 (ER+PR+Her2+, GR+/-)

células de TBNC MDA-MB-231 (ER-PR-Her2-, GR++)

Antes de probar la inhibición del crecimiento celular, las células de cáncer de mama se caracterizaron por la expresión del receptor de AR y GR por FACS como se describió anteriormente. Los datos en la figura 18 confirman la expresión del receptor como se indica en la bibliografía.

Para el ensayo citotóxico, las células se sembraron en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos en medios que contenían suero tratado con carbón vegetal. Después de 24 horas, se añadieron compuestos de prueba a las células. Se usó DMSO como control negativo del vehículo y RU486 como control positivo. Después de 72 horas de incubación, las células se cosecharon y se lisaron para determinar la viabilidad celular usando el ensayo Cell Titer Glow.

La tabla VI muestra la CI<sub>50</sub> de CB-03-06 en las líneas celulares de cáncer de mama mencionadas anteriormente.

	<b>MCF7 (ER<sup>+</sup>PR<sup>+</sup>GR<sup>+/-</sup>)</b>	<b>MDA-MB-231 (ER<sup>-</sup>PR<sup>-</sup>GR<sup>++</sup>)</b>
RU486	No activo	435
CB-03-06	25	46

- 10 CB-03-06 está activo en ambas líneas celulares de cáncer de mama, pero parece más activo en las células MCF7 que en MDA-MB-231, quizás insinuando que el GR no es la única diana de este compuesto. RU486, mifepristona, (antagonista de GR/PR) no afecta, como se esperaba, a la viabilidad de las células MCF7 GR<sup>+/-</sup>, aunque inhiben, en un grado muy bajo, la viabilidad de células MDA-MB-231 TNBC GR<sup>+</sup> hasta un máximo del 25 % a 100 µM.
- 15 Curiosamente, CB-03-05 solo está activo en MCF7, no en MDA-MB-231. No está claro qué receptor es responsable de este efecto diferencial porque estas células son diferentes para al menos 4 receptores. Si no es GR, entonces podría ser ER (receptor de estrógeno) (ER), PR (receptor de progesterona) o Her2 que se expresan en MCF7 pero no en MDA MDA-MB-231.

## 20 **CONCLUSIÓN GENERAL**

Estos ejemplos demuestran que el 17α-benzoato de cortexolona (CB-03-06), en particular, tiene una actividad superior más allá de otros compuestos derivados de cortexolona conocidos. Se han observado mejores resultados tanto *in vitro* como *in vivo* en términos de, por ejemplo,

25

- I) actividad antitumoral general *in vitro*;
- 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 (IT); y

30 V) Actividad antitumoral *in vivo* contra tumores pancreáticos y de próstata.

- I) Está claro a partir de los datos mostrados en la tabla I que los compuestos derivados de cortexolona destruyen células cancerosas a diversas concentraciones y CI<sub>50</sub>. Sin embargo, CB-03-06 y CB-03-10 muestran la mejor CI<sub>50</sub> en comparación con los otros compuestos en la serie derivada de cortexolona a través de líneas celulares de cáncer de diferente origen. Incluso el metabolito CB-03-05 de CB-03-10, muestra un buen valor de CI<sub>50</sub> en células de cáncer de próstata LNCaP (CI<sub>50</sub> 32 microM). La CI<sub>50</sub> más baja supone una actividad antitumoral *in vitro* más fuerte.
- 35

Nombre de la línea celular	CB-03-01 C17 prop	CB-03-03 C17,21 but	CB-03-04 9dehy 17 but	CB-03-05 C17 val	CB-03-06 C17 ben	CB-03-10 C17,21 val	Enza lutamida	CPA
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. IC<sub>50</sub> de compuestos derivados de corexolona probados en líneas celulares de cáncer de próstata y de páncreas

II) La expresión del receptor de andrógenos (AR) se probó en las líneas celulares de cáncer, ver Tabla II

- 5 Como 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. En particular, la actividad de CB-03-06 y CB-03-10 es independiente del receptor de andrógenos. CB-03-04 muestra una CI<sub>50</sub> de 46 cuando se prueba en LNCaP (línea celular de cáncer de próstata que expresa el receptor de andrógenos) pero una CI<sub>50</sub> mucho más alto (135) cuando se prueba en PC3 que expresa receptores de andrógenos bajos o nulos. CB-03-06 y CB-03-10 mostraron una
- 10 muy buena CI<sub>50</sub> casi independientemente de la expresión de AR. El mismo comportamiento se observó en las líneas celulares pancreáticas.

Nombre de la línea celular	CB-03-01 C17 prop	CB-03-03 C17,21 but	CB-03-04 9dehy 17 but	CB-03-05 C17 val	CB-03-06 C17 ben	CB-03-10 C17,21 val	Enza lutamida	CPA	Expresión 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 AR de las líneas celulares de cáncer de próstata y de páncreas e IC<sub>50</sub> de compuestos derivados de cortexolona

- 15 III) El índice terapéutico (IT) (también denominado ventana terapéutica, ventana de seguridad o relación terapéutica) es una comparación de la cantidad de un agente terapéutico que causa el efecto terapéutico con la cantidad que causa toxicidad. La CI<sub>50</sub> de los compuestos se determinó en células frescas aisladas a partir de sangre humana (CMSP). La toxicidad del compuesto se determinó de la siguiente manera:

20 **Índice terapéutico** = Seguridad/Potencia = CMSP estimuladas de IC<sub>50</sub> / células de cáncer de IC<sub>50</sub>

Los resultados se muestran en la tabla VII. Todos los compuestos derivados de cortexolona muestran un perfil de toxicidad seguro. Sin embargo, CB-03-06 mostró el índice terapéutico más alto cuando se probó en las 7 líneas celulares de cáncer probadas *in vitro*.

5

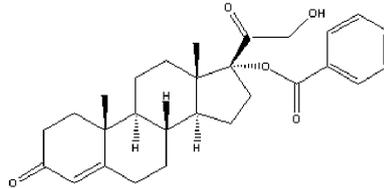
Índice terapéutico = PBMC estimuladas por IC50 / célula de cáncer IC50									
Tipo de tejido	Nombre de la línea celular	CB-03-01 C17 prop	CB-03-03 C17,21 but	CB-03-04 9dehy 17 but	CB-03-05 C17 val	CB-03-06 C17 ben	CB-03-10 C17,21 val	Enza lutamida	CPA
Cáncer de próstata	LNCaP	0	9	8	4	8	9	2	3
	PC3	0	3	3	1	3	2	1	1
Cáncer de páncreas	Panc1	0	2	1	2	3	2	1	1
	MiaPaca2	0	5	2	2	5	3	1	2
	BxPC3					3	3	1	
Cáncer de pecho	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 xortexolona en un panel de líneas celulares de cáncer

10 IV) Cáncer de mama triple negativo (TNBC) como se muestra en el ejemplo 24. La actividad citotóxica mostrada por CB-03-06 es particularmente impresionante porque generalmente los agentes terapéuticos convencionales no funcionan en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (TNBC). TNBC se define como la ausencia de expresión del receptor de estrógeno y progesterona, así como la amplificación de ERBB2. No tiene respuesta a las terapias endocrinas o anti-ERBB2. Estudios recientes han descubierto algunas dianas terapéuticas potenciales para TNBC. Sin embargo, todavía tiene un mal desenlace. Teniendo en cuenta la actividad citotóxica y el excelente perfil de seguridad de CB-03-06; CB-03-06 es un candidato nuevo y mejorado para el tratamiento clínico de este cáncer.

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



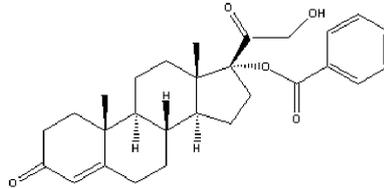
5

17α-benzoato de cortexolona

para su uso como medicamento.

10 2. El compuesto según la reivindicación 1, para su uso en terapia como agente antitumoral.

3. Un compuesto que tiene la fórmula:



15

17α-benzoato de cortexolona

para su uso en el tratamiento de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales; opcionalmente, donde dicha enfermedad tumoral incluye neoplasias malignas y metástasis.

20 4. El compuesto para su uso según la reivindicación 2 o 3, donde dichas enfermedades tumorales son tumores sólidos, preferentemente donde los tumores sólidos son tumores epiteliales; más preferentemente donde los tumores epiteliales son carcinoma de próstata; carcinoma mamario; carcinoma pancreático; carcinoma de pulmón; carcinoma del tracto gastrointestinal, tal como carcinoma de colon; cáncer de riñón; carcinoma de tiroides; carcinoma uterino; y carcinoma suprarrenal.

25

5. El compuesto para su uso según la reivindicación 4, donde los tumores epiteliales son:

carcinoma de próstata, preferentemente donde el carcinoma de próstata es o se vuelve resistente a la terapia antiandrogénica dirigida, tal como enzalutamida;

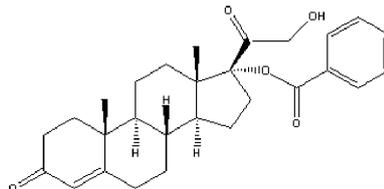
30

carcinoma pancreático, preferentemente carcinoma pancreático exocrino;

carcinoma mamario, preferentemente cáncer de mama triple negativo; y preferentemente donde el carcinoma mamario es cáncer de mama triple negativo y el sujeto está en recaída o no responde a la terapia convencional; o carcinoma del tracto gastrointestinal, tal como carcinoma de colon.

35

6. Un compuesto que tiene la fórmula:

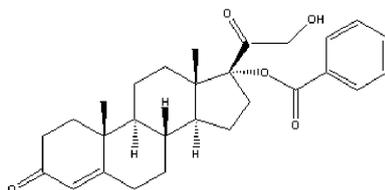


17α-benzoato de cortexolona

40 para su uso en terapia como modulador del receptor de glucocorticoides, preferentemente para su uso en terapia

como agonista de glucocorticoides.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto que tiene la fórmula:



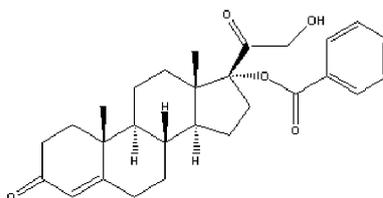
5

17α-benzoato de cortexolona

y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable para su uso como medicamento.

10 8. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, para su uso en terapia como agente antitumoral.

9. La composición farmacéutica que comprende un compuesto que tiene la fórmula:



15

y al menos un excipiente fisiológicamente aceptable para su uso en el tratamiento de lesiones precancerosas, displasias, metaplasias y enfermedades tumorales.

10. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 - 9, que comprende al menos otro principio activo, preferentemente un principio activo quimioterapéutico.

11. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 - 9, y al menos otro principio activo, preferentemente un principio activo quimioterapéutico, para administración simultánea, separada o secuencial.

25

12. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11, donde dichas enfermedades tumorales incluyen neoplasias malignas y metástasis.

13. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 12, donde dichas enfermedades tumorales son tumores sólidos, preferentemente tumores epiteliales; tales como carcinoma de próstata; carcinoma mamario; carcinoma pancreático; carcinoma de pulmón; carcinoma del tracto gastrointestinal, tal como carcinoma de colon; cáncer de riñón; carcinoma de tiroides; carcinoma uterino; o carcinoma suprarrenal.

14. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 13, donde dichos tumores epiteliales son

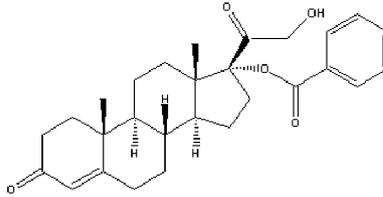
carcinoma de próstata, preferentemente donde el carcinoma de próstata es o se vuelve resistente a la terapia antiandrogénica dirigida, tal como enzalutamida;

carcinoma pancreático, preferentemente carcinoma pancreático exocrino;

carcinoma mamario, preferentemente cáncer de mama triple negativo, preferentemente donde el carcinoma mamario es cáncer de mama triple negativo y el sujeto está en recaída o no responde a la terapia convencional; o carcinoma del tracto gastrointestinal, tal como carcinoma de colon.

15. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto que tiene la fórmula:

45



para su uso en terapia como modulador del receptor de glucocorticoides, preferentemente para su uso en terapia como agonista de glucocorticoides.

5

16. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 15, que comprende al menos otro principio activo, preferentemente un principio activo quimioterapéutico.

17. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 15, y al menos otro principio activo, 10 preferentemente un principio activo quimioterapéutico, para administración simultánea, separada o secuencial.

Actividad antitumoral de CB-03-06 frente a vehículo

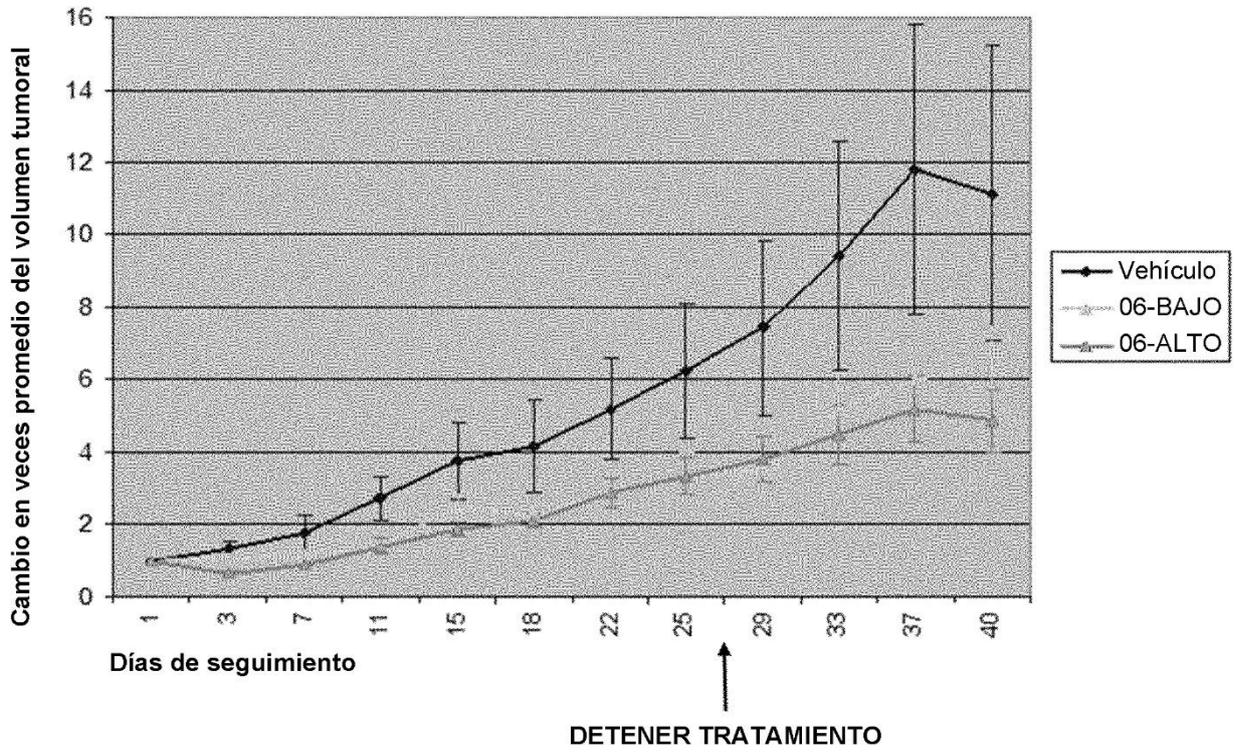


Figura 1

Actividad antitumoral de CB-03-10 frente a vehículo

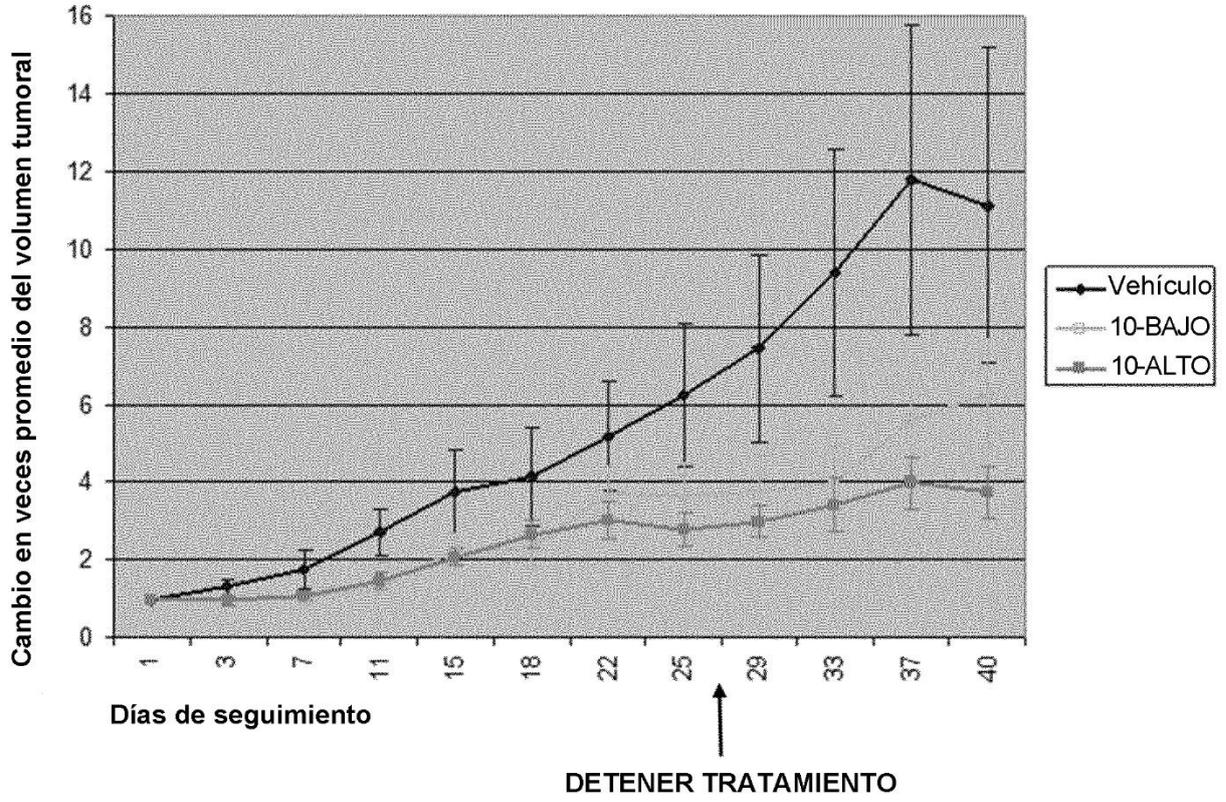


Figura 2

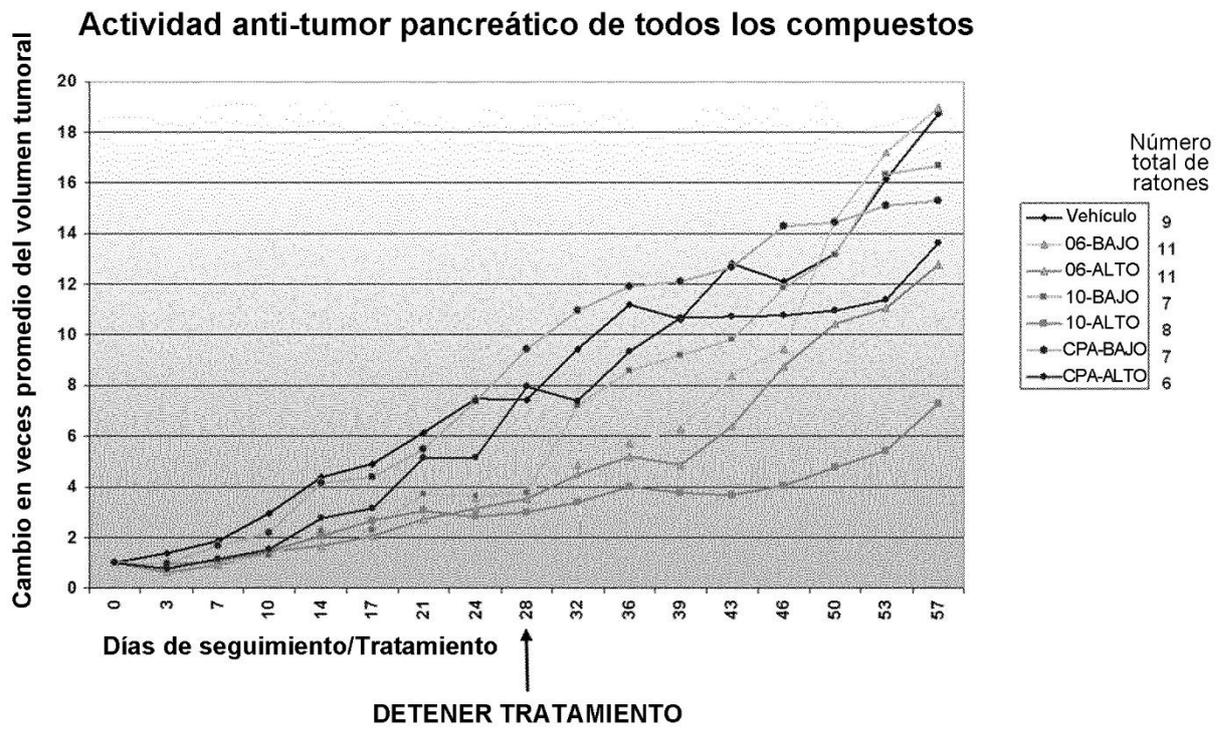


Figura 3

Actividad antitumoral de CB-03-06 frente a CB-03-10

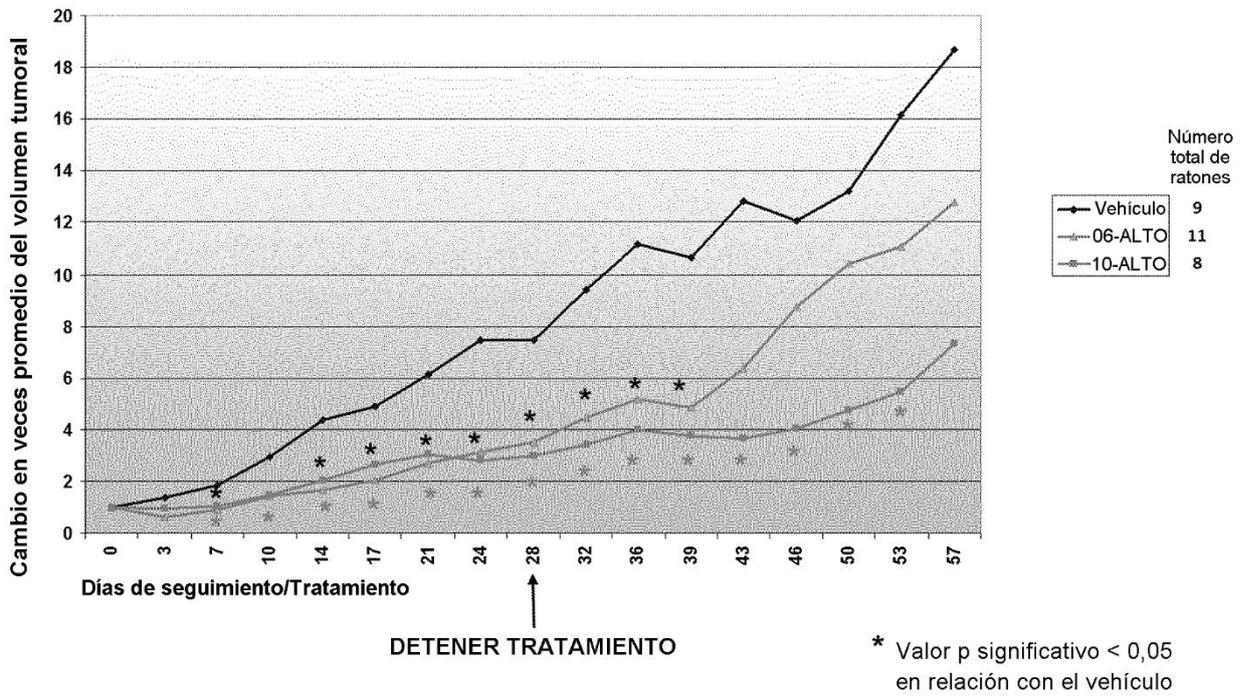
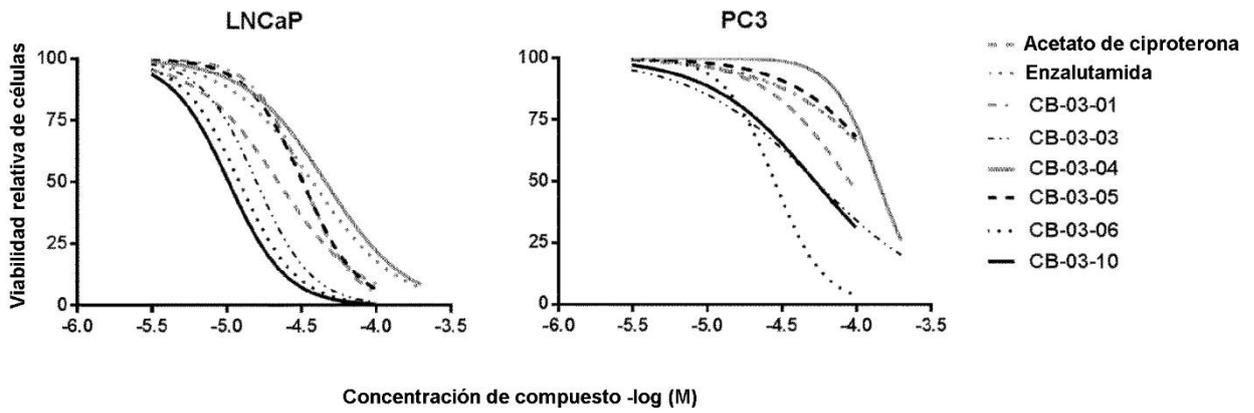


Figura 4

(a) Viabilidad de células de cáncer de próstata



(b) Viabilidad Celular del Cáncer de Páncreas

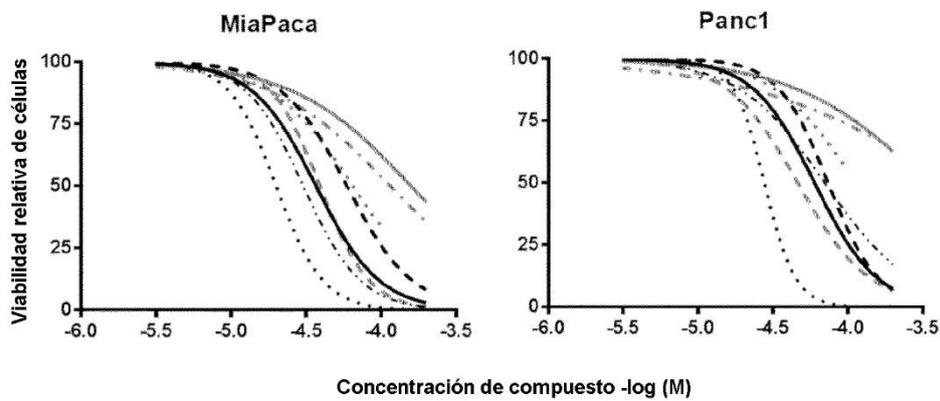
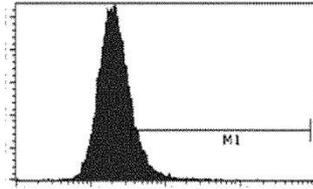
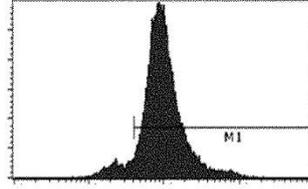


Figura 5

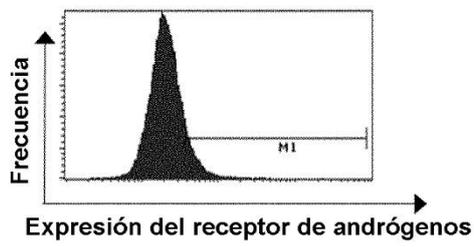
(a) PC-3 Próstata



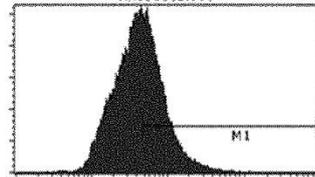
(b) LNCaP Próstata



(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

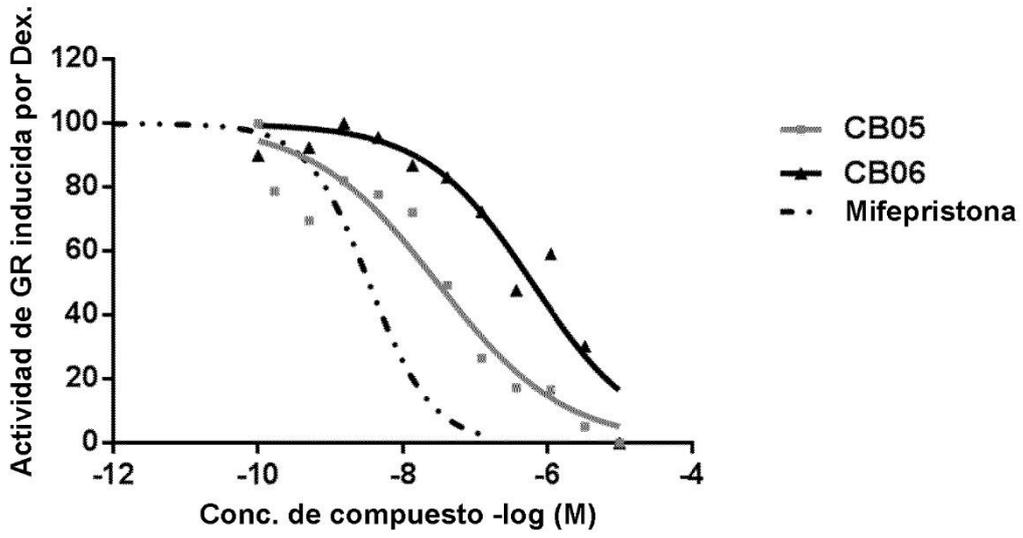


Figura 7

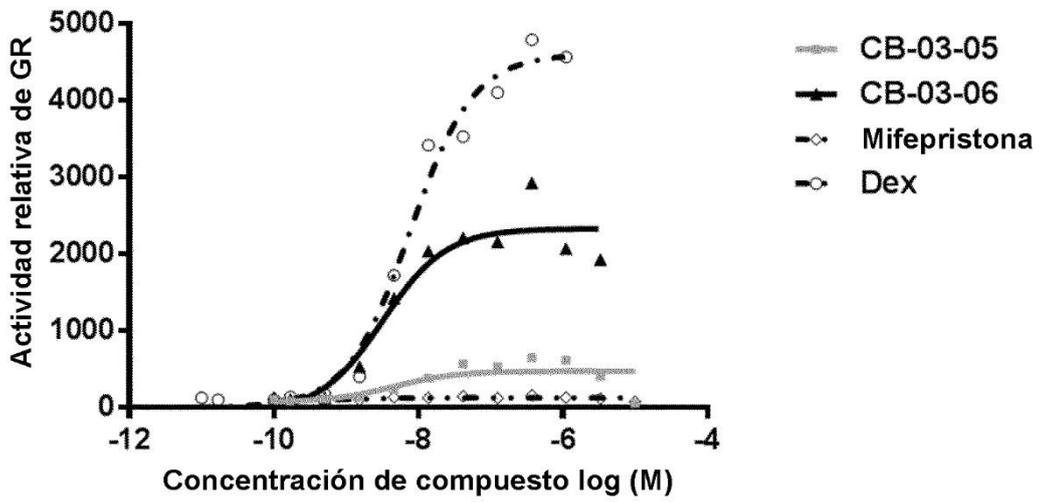


Figura 8

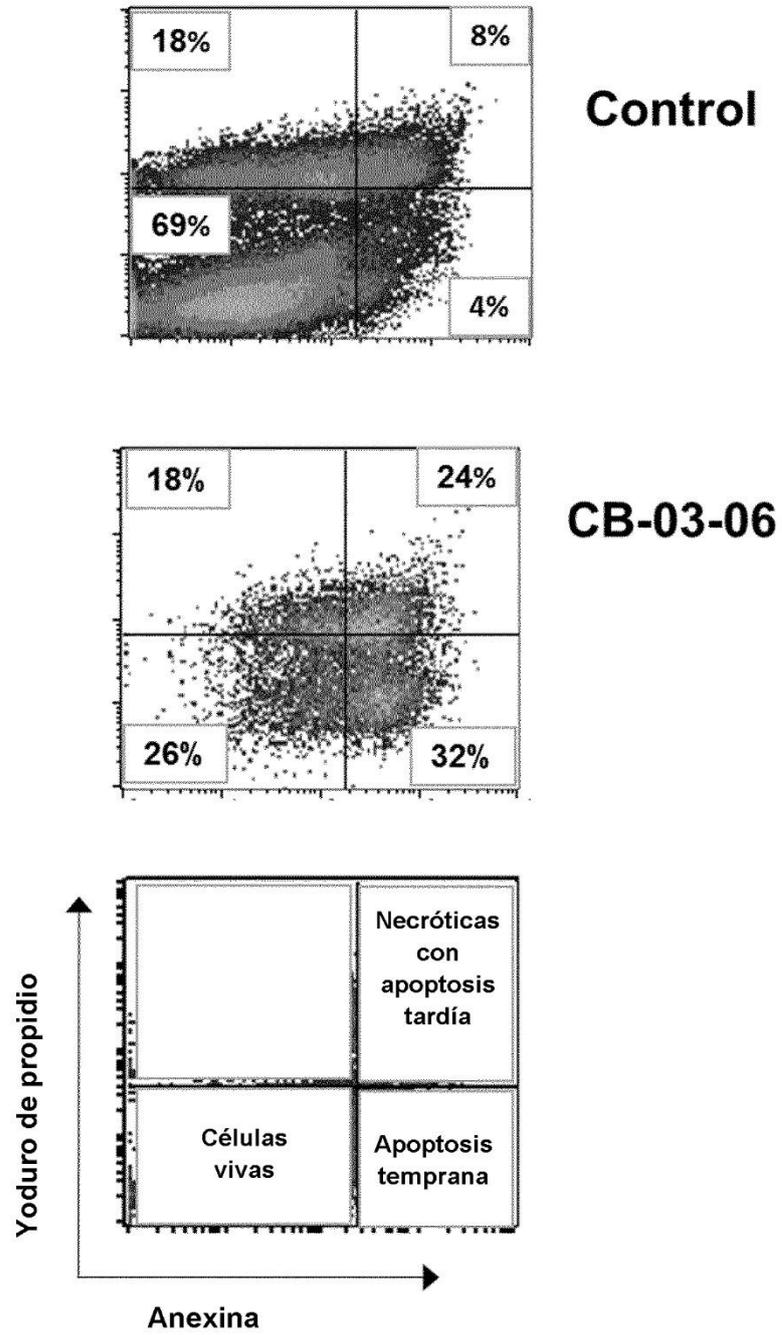


Figura 9

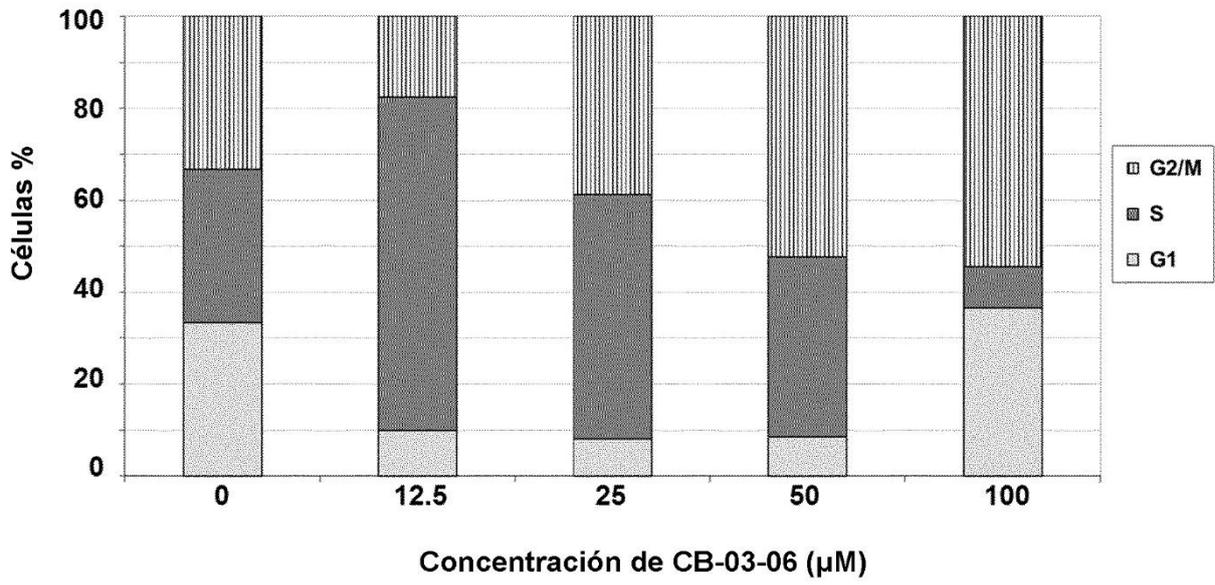


Figura 10

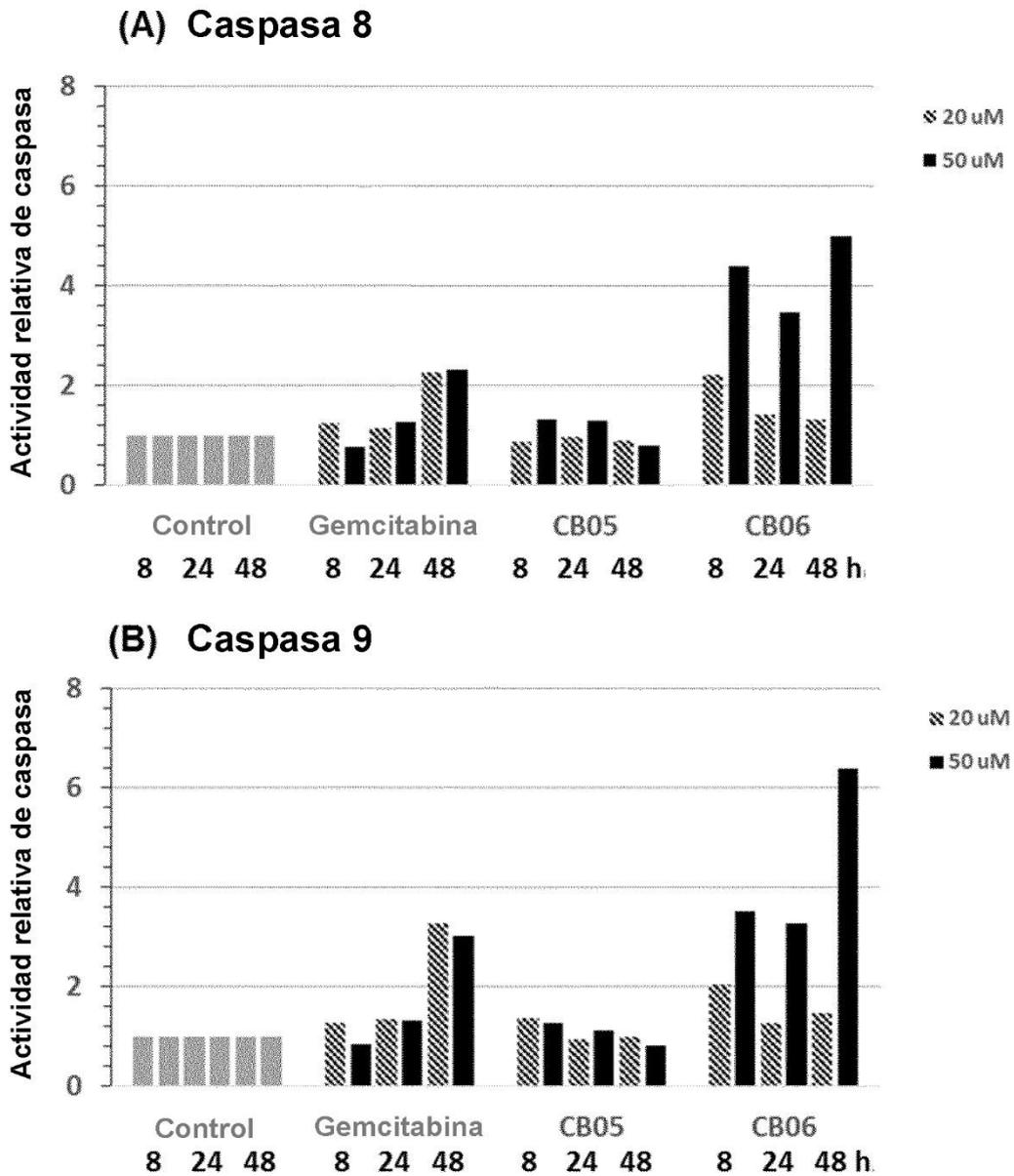


Figura 11

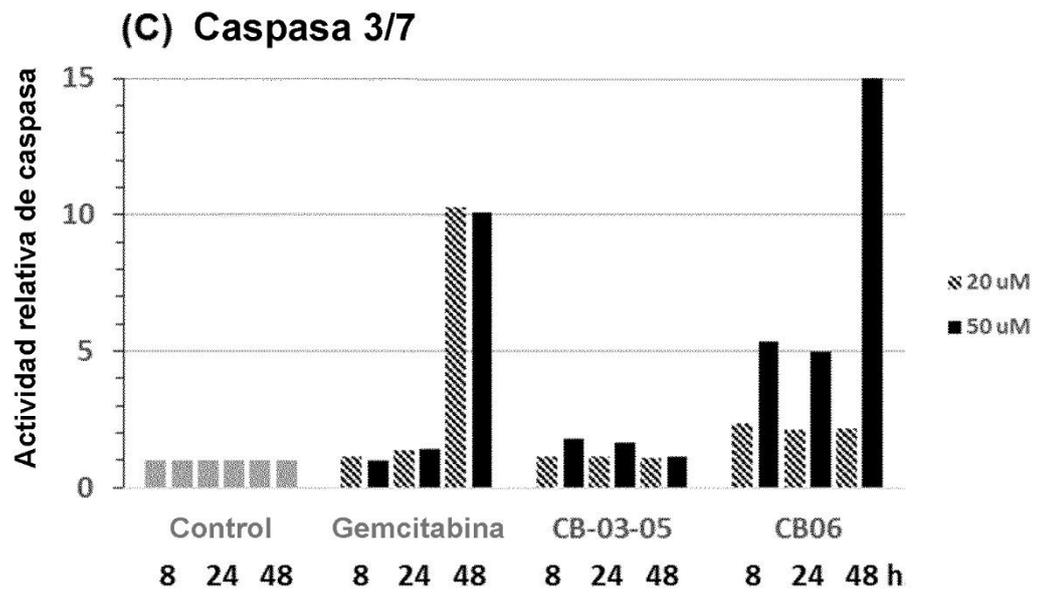


Figura 11

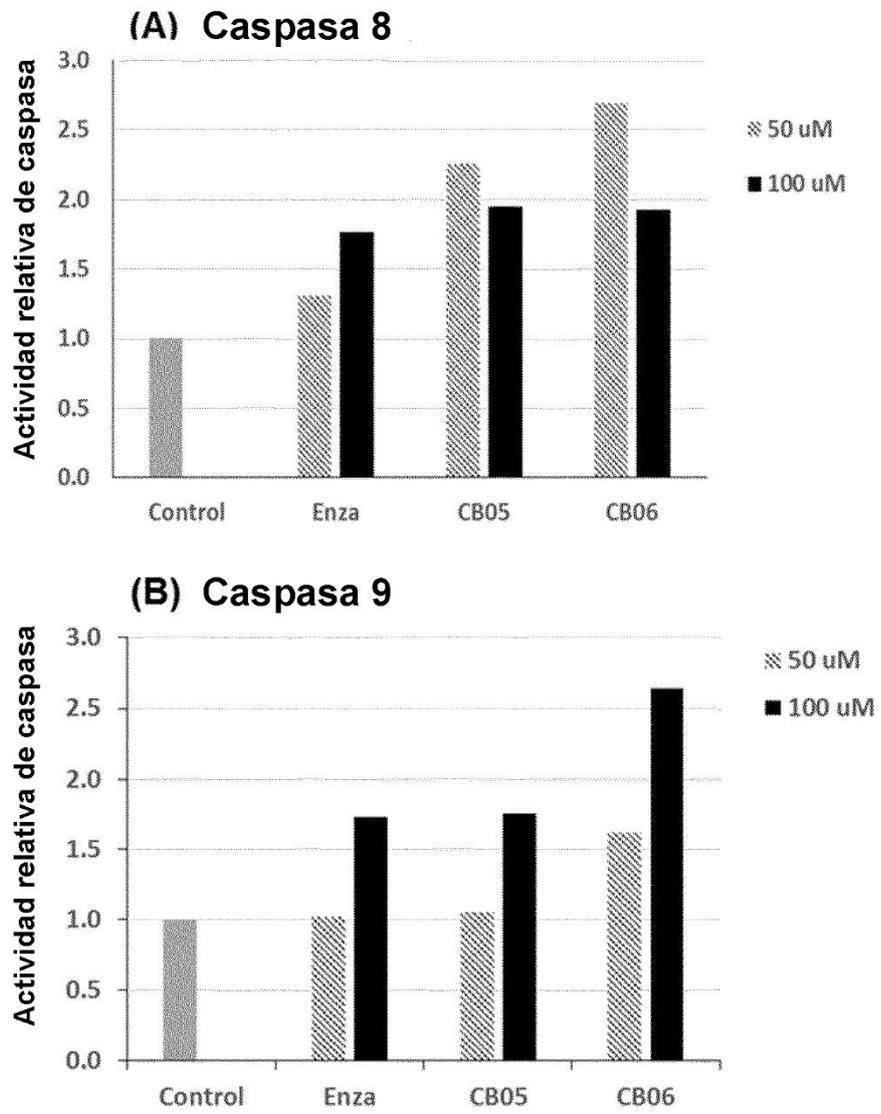


Figura 12

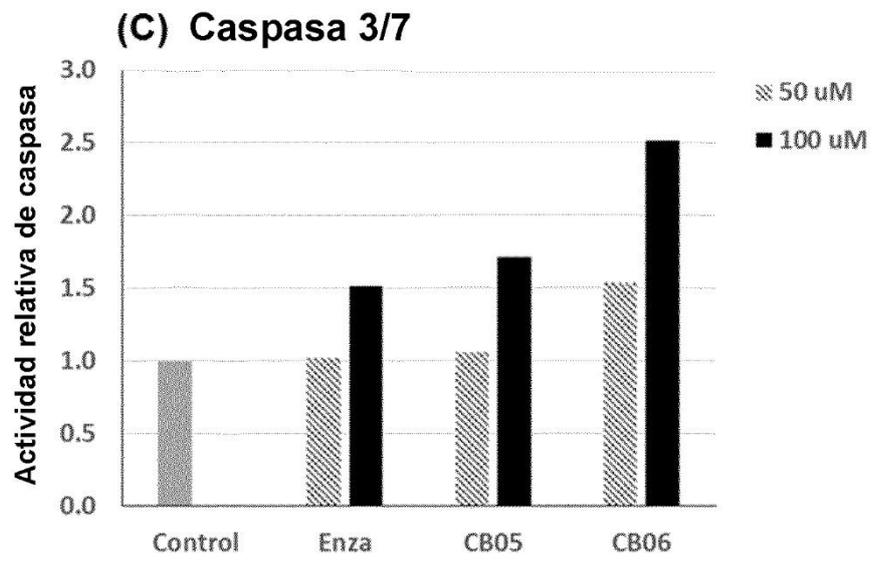


Figura 12

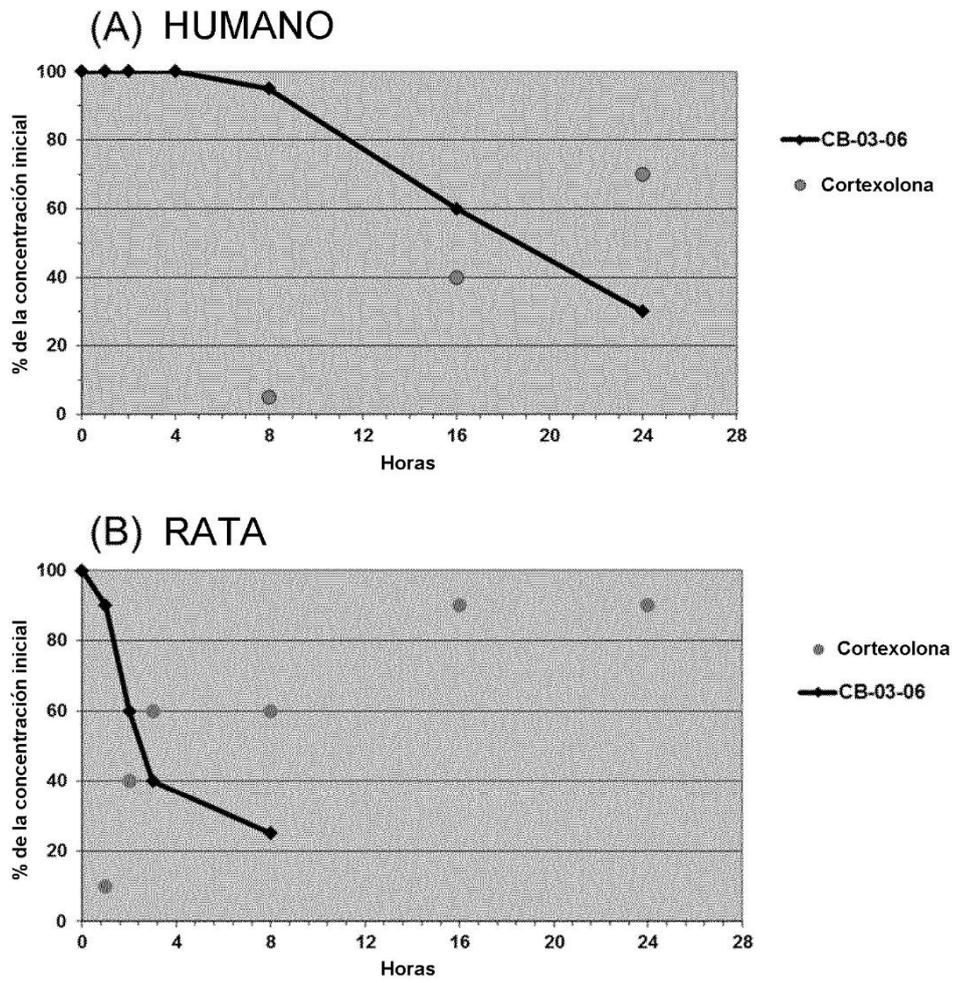
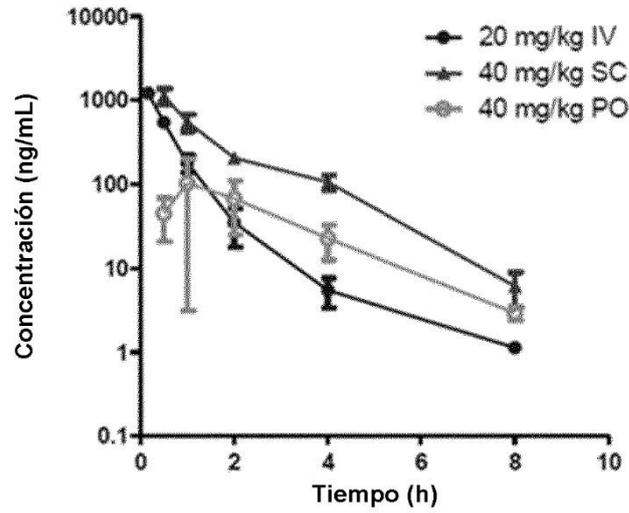


Figura 13

Farmacocinética de CB-03-06 en administración IV, SC y PO en ratones



Vía	Dosificación	C <sub>0</sub>	T <sub>max</sub>	C <sub>max</sub>	T <sub>1/2</sub>	AUC <sub>last</sub>	AUC <sub>inf</sub>	Cl	V <sub>ss</sub>	F%
		(ng/ml.)	(hr)	(ng/ml.)	(hr)	(hr*ng/ml.)	(hr*ng/ml.)	(L/hr/kg)	(L/kg)	
IV	20	1840	0.167	1230	1.02	896	897	22.3	12.6	
SC	40		0.5	1130	1.12	1620	1630			90.9%
PO	40		1	103	1.33	276	282			15.7%

Figura 14

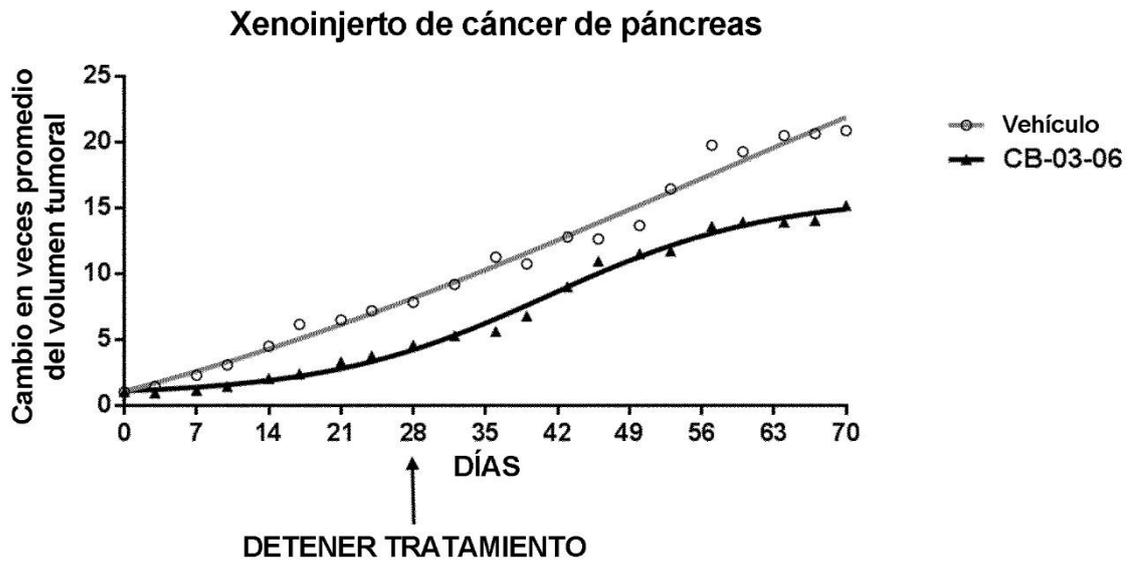


Figura 15

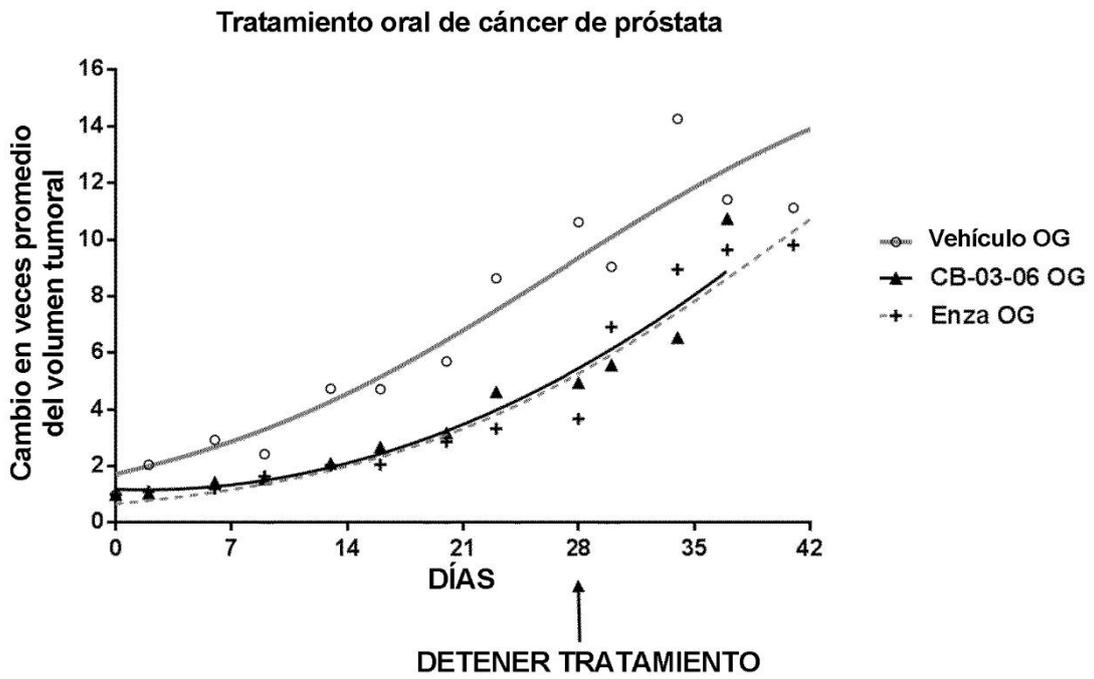


Figura 16

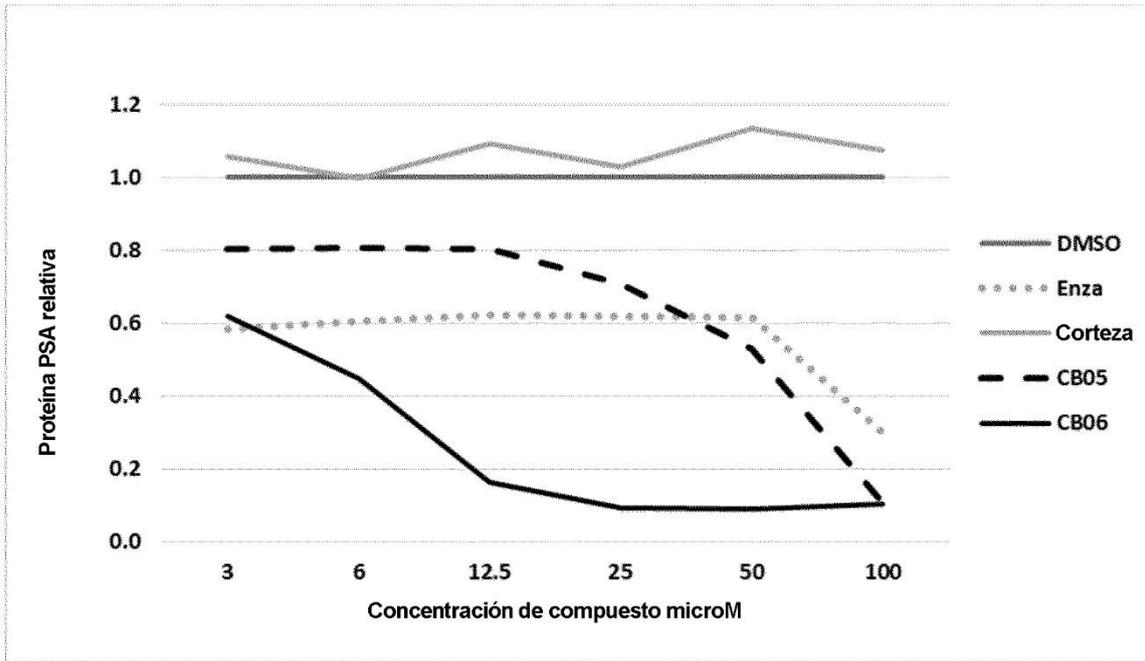
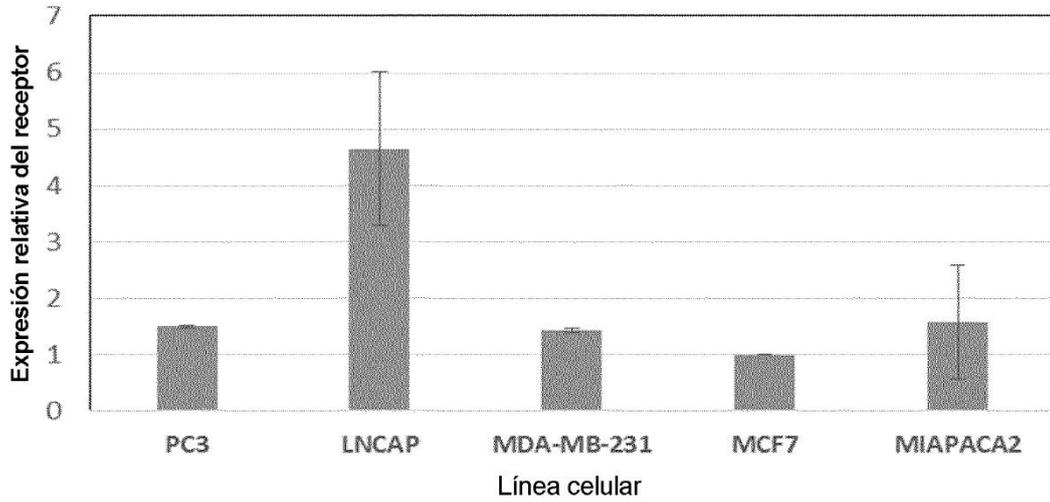


Figura 17

### EXPRESIÓN DE AR



### EXPRESIÓN DE GR

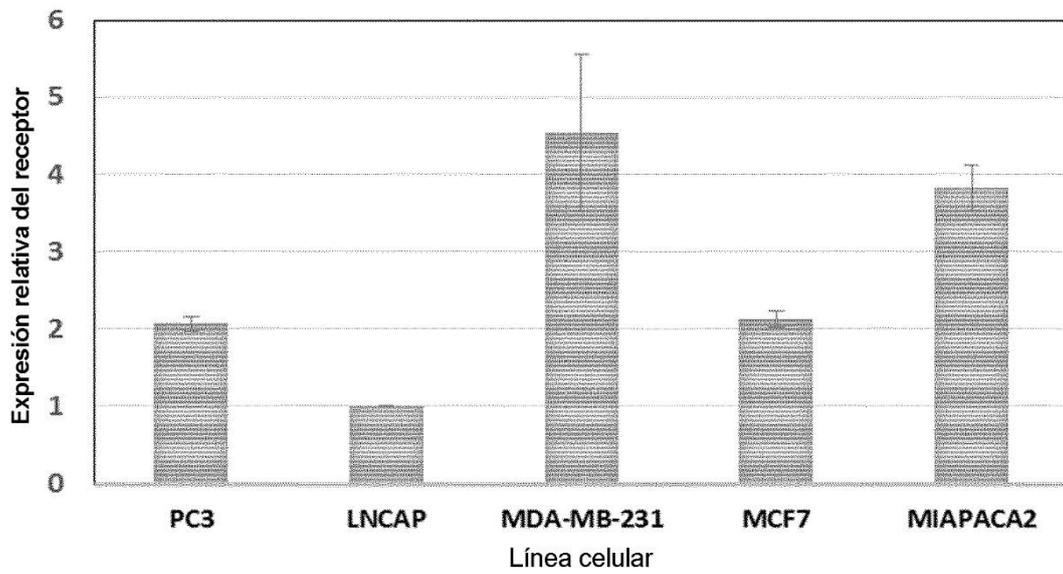


Figura 18