



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 303 624**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01)

A61K 31/35 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04030912 .2**

(86) Fecha de presentación : **12.10.1994**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1523982**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **20.04.2005**

(54) Título: **Fenilacetato y derivados solos o en combinación con otros compuestos contra afecciones neoplásicas y otros trastornos.**

(30) Prioridad: **12.10.1993 US 135661**
07.03.1994 US 207521

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2008

(73) Titular/es: **THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA as represented by the SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES**
National Institute of Health
Office of Technology Transfer
Westwood Building, Box OTT
Bethesda, Maryland 20892-9902, US

(72) Inventor/es: **Dvorit, Samid Ph.D**

(74) Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

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

Fenilacetato y derivados solos o en combinación con otros compuestos contra afecciones neoplásicas y otros trastornos.

I. Campo de la invención

Esta invención se refiere a medios para usar ácido fenilacético y sus derivados farmacéuticamente aceptables para tratar y prevenir patologías y para modular actividades celulares. En particular, esta invención se refiere a A) el uso de ácido fenilacético y sus derivados en el tratamiento o la prevención de cáncer, F) medios para controlar el nivel de dosificación de ácido fenilacético y sus derivados en un paciente y/o la respuesta del paciente a estos fármacos, G) la activación del PPAR por el ácido fenilacético y sus derivados, el uso de ácido fenilacético y sus derivados en combinación con agentes que interaccionan con receptores de retinoides y el uso de ácido fenilacético y sus derivados como agentes sensibilizantes o protectores frente a radiación o quimioterapia basada en radicales libres, H) el uso del ácido fenilacético y sus derivados en el tratamiento de cánceres que tienen un fenotipo multirresistente a fármacos, I) ácido fenilacético y sus derivados, correlación entre potencia y lipofilicidad, O) ácido fenilacético y sus derivados en estudios humanos relacionados con tratamientos con PA y PB, P) ácido fenilacético y sus derivados en usos para alterar el metabolismo lipídico, incluyendo la disminución de triglicéridos séricos, Q) inducción de HbF por ácido fenilacético y sus derivados en células malignas y no malignas y R) procedimientos para administrar ácido fenilacético y sus derivados.

II. Antecedentes de la invención

El ácido fenilacético (PAA) es un producto de la descomposición de proteínas encontrado por todo el espectro filogenético, desde bacterias al ser humano. Altamente conservado a lo largo de la evolución, el PAA puede jugar un papel fundamental en el control del crecimiento y la diferenciación. En plantas, el PAA sirve como una hormona del crecimiento (auxina) que promueve la proliferación y el crecimiento celular a bajas dosis (10^{-5} - 10^{-7} M), mientras que inhibe el crecimiento a mayores concentraciones. El efecto en células animales y humanas está menos caracterizado. Se conoce que en seres humanos el PAA se conjuga con glutamina con excreción renal posterior de fenilacetilglutamina (PAG). La última, que conduce a la excreción de nitrógeno residual, ha sido la base para el uso de PAA o preferiblemente su sal sódica de fenilacetato (NaPA, a la que también se hace referencia en este documento como resto aniónico activo, fenilacetato o "PA") en el tratamiento de hiperamoniemia asociada a errores congénitos de la ureagénesis. La experiencia clínica indica que el tratamiento único o a largo plazo con altas dosis de NaPA se tolera bien, está esencialmente libre de efectos adversos y es eficaz para eliminar el exceso de glutamina. [Brusilow, S. W., Horwich, A. L. Urea cycle enzymes. Metabolic Basis of Inherited Diseases, Vol. 6:629-633 (1989)].

La glutamina es la principal fuente de nitrógeno para la síntesis de ácido nucleico y proteínas y un sustrato para energía en células normales y tumorales que se dividen rápidamente. En comparación con tejidos normales, la mayoría de los tumores, debido a la síntesis disminuida de glutamina junto con utilización y catabolismo acelerados, funcionan a niveles limitantes de disponibilidad de glutamina y, como consecuencia, son sensibles al agotamiento adicional de glutamina. Teniendo en cuenta el desequilibrio del metabolismo de la glutamina en células tumorales y la capacidad del PAA para retirar glutamina, se ha propuesto el PAA como un potencial agente antitumoral; sin embargo, no se han proporcionado previamente datos para corroborar esta propuesta. [Neish, W. J. P. "Phenylacetic Acid as a Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Human Cancer", Experientia, Vol. 27, págs. 860-861 (1971)].

A pesar de estos esfuerzos para combatir el cáncer, muchas enfermedades malignas que son de interés en esta solicitud continúan presentando importantes desafíos a la oncología clínica. El cáncer de próstata, por ejemplo, es la segunda causa más común de muerte por cáncer en hombres. Los actuales protocolos de tratamiento se basan principalmente en manipulaciones hormonales. Sin embargo, a pesar de las elevadas tasas iniciales de respuesta, los pacientes desarrollan a menudo tumores resistentes a hormonas, lo que conduce a una rápida progresión de la enfermedad con mal pronóstico. En conjunto, los resultados de la quimioterapia citotóxica han sido decepcionantes, indicando una necesidad percibida desde hace tiempo de nuevos enfoques para el tratamiento del cáncer prostático avanzado. Otras enfermedades resultantes de la replicación celular anormal, por ejemplo, melanomas metastásicos, tumores cerebrales de origen glial (por ejemplo, astrocitomas) y adenocarcinoma de pulmón también son tumores malignos muy agresivos con mal pronóstico. La incidencia del melanoma y del adenocarcinoma de pulmón ha aumentado significativamente en años recientes. Los tratamientos quirúrgicos de tumores cerebrales a menudo no consiguen retirar todos los tejidos tumorales, dando como resultado recurrencias. La quimioterapia sistémica se ve impedida por barreras sanguíneas. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevos enfoques para el tratamiento de tumores malignos humanos incluyendo cáncer prostático avanzado, melanoma y tumores cerebrales.

Además de su capacidad para unirse a la glutamina para formar fenilacetato de glutamina, el ácido fenilacético (PAA) puede inducir la diferenciación de células tumorales. El PAA es un potenciador no tóxico de la diferenciación y tiene actividad antitumoral en modelos de laboratorio y en el hombre. Los estudios preclínicos indican que el fenilacetato y los ácidos grasos aromáticos relacionados inducen citostasis y promueven la maduración de diversas células malignas humanas, incluyendo carcinoma prostático resistente a hormonas y glioblastoma. Los marcados cambios en la biología tumoral están asociados a alteraciones en la expresión de genes implicados en el crecimiento, la invasión, la angiogénesis y la inmunogenicidad del tumor. El PAA y sus análogos parecen compartir varios mecanismos de acción, incluyendo: (a) regulación de la expresión génica por activación de un receptor nuclear y (b) inhibición de la vía del

mevalonato y de la isoprenilación de proteínas. Por tanto, el PAA parece particularmente adecuado para el tratamiento de diversas afecciones neoplásicas.

Una de tales afecciones neoplásicas que se pueden tratar mediante NaPA es el neuroblastoma. Como un tumor maligno infantil, el neuroblastoma ha demostrado ser fascinante tanto desde el punto de vista biológico como del clínico. Este cáncer tiene la tasa más elevada de diferenciación espontánea de todos los tumores malignos y se ha descrito que varios agentes inducen la maduración del neuroblastoma en una diversidad de células que comparten un linaje de cresta neural (Evans, A. E., Chatten, J., D'Angio, G. J., Gerson, J. M., Robinson, J. y Schnauffer, L. A review of 17 IV-S neuroblastoma patients at the Children's Hospital of Philadelphia. *Cancer*, 45:833-839, 1980; Abemayor, E. y Sidell, N. Human neuroblastoma cell lines as models for the *in vitro* study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Environ. Health Perspect.*, 80:3-15, 1989). Entre los compuestos que se han explorado como agentes de diferenciación, se ha demostrado que el ácido retinoico (RA) (Sidell, N., Altman, A., Haussler, M. R. y Seeger, R. C. Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Expl. Cell Res.*, 148:21-30, 1983) es un potente compuesto para promover la diferenciación de una diversidad de líneas celulares humanas de neuroblastoma (Abemayor, E. y Sidell, N. Human neuroblastoma cell lines as models for the *in vitro* study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Environ. Health Perspect.*, 80:3-15, 1989; Sidell, N., Altman, A., Haussler, M. R. y Seeger, R. C. Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Expl. Cell Res.*, 148:21-30, 1983; Thiele, C. T., Reynolds, C. P. e Israel, M. A. Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature*, 313:404-406, 1985); sin embargo, hasta la fecha el RA ha demostrado solamente una limitada eficacia clínica en esta enfermedad (Finklestein, J. Z., Krailo, M. D. Lenarsky, C., Ladisch, S., Blair, G. K., Reynolds, C. P., Sitary, A. L. y Hammond, G. D., 13-cis-retinoic acid (NSC 122758) in the treatment of children with metastatic neuroblastoma unresponsive to conventional chemotherapy: Report from the Children's Cancer Study Group. *Med. Ped. Oncol.*, 20:307-311, 1992). A fin de aumentar la eficacia de la diferenciación inducida por RA del neuroblastoma humano, varios compuestos diferentes y modificadores de respuesta biológica, tales como agentes incrementadores de AMPc e interferonas, pueden potenciar la actividad retinoide así como convertir en resistentes poblaciones sensibles a tratamiento con RA (Lando, M., Abemayor, E., Verity, M. A. y Sidell, N. Modulation of intracellular cyclic AMP levels and the differentiation response of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.*, 50:722-727, 1990; Wuarin, L., Verity, M. A. y Sidell, N. Effects of gamma-interferon and its interaction with retinoic acid on human neuroblastoma cells. *Int. J. Cancer*, 48:136-144, 1991). Algunos de estos tratamientos de combinación se están evaluando actualmente de forma clínica o se proponen para el tratamiento de neuroblastoma y otros tumores malignos (Smith, M. A., Parkinson, D. R., Cheson, B. D. y Friedman, M. A. Retinoids in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.*, 10:839-864, 1992). Sin embargo, existe una necesidad de tratamientos de combinación más eficaces para el tratamiento de neuroblastoma y otros cánceres y patologías similares.

Otra afección neoplásica que hasta ahora ha sido difícil de tratar es el glioma maligno. Los gliomas malignos dependen en gran medida de la vía del mevalonato (MVA) para la síntesis de esteroides e isoprenoides críticos para la replicación celular (Fumagalli, R., Grossi, E., Paoletti, P. y Paolette, R. Studies on lipids in brain tumors. I. Occurrence and significance of sterol precursors of cholesterol in human brain tumors. *J. Neurochem.* 11:561-565, 1964; Kandutsch, A. A. y Saucier, S. E. Regulation of sterol synthesis in developing brains of normal and jimpy mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 135:201-208, 1969; Grossi, E., Paoletti, P. y Paoletti, R. An analysis of brain cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 66:564-572, 1958; Azarnoff, D. L., Curran, G. L. y Williamson, W. P. Incorporation of acetate-1-¹⁴C into cholesterol by human intracranial tumors *in vitro*. *J. Nat. Cancer Inst.* 21:1109-1115, 1958; Rudling, M. J., Angelin, B., Peterson, C. O. y Collins, V. P. Low density lipoprotein receptor activity in human intracranial tumors and its relation to cholesterol requirement. *Cancer Res.* 50 (supl): 483-487, 1990). Se esperaría que la síntesis dirigida y/o utilización del MVA inhibiera el crecimiento tumoral sin dañar los tejidos cerebrales normales, en los que la vía del MVA es mínimamente activa. Dos enzimas controlan las etapas limitantes de la velocidad de la vía del MVA de la síntesis de colesterol: (a) la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa cataliza la síntesis del MVA a partir de acetil-CoA; y (b) la MVA-pirofosfato (MVA-PP) descarboxilasa controla la utilización del MVA y, como consecuencia, el procesamiento post-traduccional y la función de proteínas de señalización intracelulares (Goldstein, J. L. y Brown, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 343:425-430, 1990; Marshall, C. J. Protein prenylation: A mediator of protein-protein interactions. *Science*. 259:1865-1866, 1993). Por lo tanto, es altamente deseable para el tratamiento de gliomas malignos u otros cánceres y patologías similares encontrar un tratamiento capaz de inhibir estas dos etapas de la vía del MVA.

Una afección neoplásica adicional que ha sido difícil de tratar es el melanoma maligno. El melanoma maligno diseccionado está caracterizado por una elevada tasa de mortalidad y resistencia a terapias convencionales (Ferdy Lejeune, Jean Bauer, Serge Leyvraz, Danielle Lienard (1993): Disseminated melanoma, preclinical therapeutic studies, clinical trial, and patient treatment. *Current Opinion in Oncology* 5:390-396). La terapia de diferenciación puede proporcionar una alternativa al tratamiento de cánceres que no responden, o responden mal, a quimioterapia citotóxica (Kelloff, G. J., Boone, C. W., Malone, E. F., Steele, V. E. (1992): Chemoprevention clinical trials. *Mutation Res.* 267:291-295). Varios inductores de diferenciación son capaces de alterar el fenotipo de células de melanoma *in vitro*. Tales inductores incluyen retinoides, butirato, dibutiril adenosina 3':5'-monofosfato cíclico (AMP dbc), 5-Azacitidina, interferonas, hexametilén bisacetamida (HMBA), dimetil formamida (DMF), dimetil sulfóxido (DMSO), acetato de 12-tetradecanilforbol-13 (TPA) (Mary J. Hendrix, Rebecca W. Wood, y col. (1990): Retinoic acid inhibition of human melanoma cell invasion through a reconstituted basement membrane and its relation to decreases in the expression of proteolytic enzymes and motility. *Cancer Research* 50:4121- 4130; Luara Giffre, Magali Schreyer, Jean-pierre Mach, Stefan Carrel (1988): Cyclic AMP induces differentiation *in vitro* of human melanoma cells. *Cancer* 61:1132-1141; Jarde-

na Nordenberg, Lina Wasserman, Einat Beery, Doron Aloni, Hagit Malik, Kurt H. Stenzel, Abraham Novogrodsky (1986): Growth inhibition of murine melanoma by butyric acid and dimethylsulfoxide. *Experimental Cell Research* 162:77-85; Eliezer Huberman, Carol Heckman, Rober Langenbach (1979): Stimulation of differentiation functions in human melanoma cells by tumor-promoting agents and dimethyl sulfoxide. *Cancer Research* 39:2618-2624; Claus Garbe, Konstantin Krasagakis (1993): Effects of interferons and cytokines on melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 100:239S-244S). Desafortunadamente, las aplicaciones clínicas de estos agentes está limitada debido a toxicidades inaceptables, preocupación con respecto a potencial carcinogénesis o una incapacidad de lograr y mantener concentraciones plasmáticas eficaces. Por lo tanto, existe la necesidad de tratamientos no tóxicos, clínicamente eficaces para melanomas malignos u otros cánceres, patologías o trastornos de la diferenciación similares.

La hidroxiurea, un inhibidor de la ribonucleótido reductasa, es un compuesto químico simple ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$, PM 76,05) que se sintetizó en un principio a finales del siglo XIX (Calabresi P, Chabner B. A. *Antineoplastic Agents*. In: Gilman AG, Rail TW, Nies AS, Taylor P, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw Hill 1990:1251-2). Posteriormente se descubrió que produce leucopenia en animales de laboratorio y posteriormente se ensayó como un agente antineoplásico (Rosenthal F, Wislicki L., Kollek L. *Ober die Beziehungen von schwersten Blutgiften zu Abbauprodukten des Eiweisses. Beitrag zum Entstehungsmechanismus der perniziösen Anämie.* *Klin. Wschr.* 1928; 7:972). Actualmente, el principal papel clínico de la hidroxiurea es en el tratamiento de trastornos mieloproliferativos. Actualmente está considerada la terapia inicial preferida para la leucemia mielogénica crónica (Donehower RC. *Hydroxyurea*. In: Chabner BA., Collins JM., eds. *Cancer Chemotherapy, Principles and Practice*, Philadelphia: JB Lippincott 1990:225-33).

La hidroxiurea se ha evaluado en varios tumores sólidos, incluyendo: melanoma maligno, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células renales y carcinoma de células de transición del urotelio (Bloedow CE. A phase II study of hydroxyurea in adults: miscellaneous tumors. *Cancer Chemother Rep* (1964; 40:39-41; Ariel IM. Therapeutic effects of hidroxyurea; experience with 118 patients with inoperable tumors. *Cancer* 1970; 25:714; Neviny H, Hall TC. Chemotherapy with hydroxyurea in renal cell carcinoma. *J. Clin. Pharmacol.* 1968; 88:352-9; Beckloff GL, Lerner HJ, Cole DR y col. Hydroxyurea in bladder carcinoma. *Invest Urol.* 1967; 530-4). Los estudios iniciales parecían prometedores para varias de estas enfermedades, pero la investigación posterior no ha definido un papel para la hidroxiurea en ninguna de las pautas de terapia convencionales para tumores sólidos.

Dado que la hidroxiurea es un agente específico del ciclo celular de fase S, es sorprendente que varios ensayos clínicos de este fármaco en cáncer de próstata metastásico resistente a hormonas han sugerido que posee alguna actividad (Lerner HJ, Malloy TR. Hydroxyurea in stage D carcinoma of prostate. *Urol* 1977; 10,35-8; Kvols LK, Eagan RT, Myers RP. Evaluation of melphalan, ICRF-159, and hydroxyurea in metastatic prostate cancer: a preliminary report. *Cancer Treat. Rep.* 1977; 61: 311-2; Loening SA, Scott WW, deKernion J y col. A Comparison of hydroxyurea, methyl-chloroethyl-cyclohexy-nitrosourea and clylophosphamide in patients with advance carcinoma of the prostate. *J. Urol* 1981; 125:812-6; Mundy AR. A pilot study of hydroxyurea in hormone "escaped" metastatic carcinoma of the prostate. *Br. J Urol* 1982; 54:20-5; Stephens RL, Vaughn C, Lane M y col. Adriamycin and cyclophosphamide versus hydroxyurea in advanced prostatic cancer. *Cancer* 1984; 53:406-10) particularmente dada (1) la naturaleza lentamente progresiva de la enfermedad y (2) los protocolos de administración de fármacos usados en estos ensayos, por ejemplo, de una vez al día a una vez cada tres días. Parecía improbable que las dosis o los protocolos de administración de hidroxiurea usados en estos ensayos recogieran una proporción significativa de células tumorales en una fase susceptible del ciclo celular. Los datos clínicos descritos con respecto a la actividad de hidroxiurea en cáncer de próstata resistente a hormonas: la tasa de respuesta objetiva global es del 23% y la frecuencia de mejora subjetiva es del 36% (Lerner HJ, Malloy TR. Hydroxyurea in stage D carcinoma of prostata. *Urol.* 1977; 10, 35-8; Kvols LK, Eagan RT, Myers RP. Evaluation of melphalan, ICRF-159, and hydroxyurea in metastatic prostate cancer: a preliminary report. *Cancer Treat. Rep.* 1977; 61: 311-2; Loening SA, Scott WW, deKernion J y col. A Comparison of hydroxyurea, methyl-chloroethyl-cyclohexy-nitrosourea and clylophosphamide in patients with advance carcinoma of the prostate. *J. Urol.* 1981; 125:812-6; Mundy AR. A pilot study of hydroxyurea in hormone "escaped" metastatic carcinoma of the prostate. *Br. J. Urol* 1982; 54:20-5; Stephens RL, Vaughn C, Lane M y col. Adriamycin and cyclophosphamide versus hydroxyurea in advanced prostatic cancer. *Cancer* 1984; 53:406-10). Por tanto, existe la necesidad de una terapia mejorada que use hidroxiurea para el tratamiento de cáncer prostático u otros similares.

El tratamiento para la mayoría de los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) ha sido hasta ahora insatisfactorio. La quimioterapia, la terapia con radiación y la cirugía son principalmente citorreductoras, que pretenden disminuir el número de células tumorales viables en el huésped. Aunque la aplicación de estas técnicas ha sido exitosa en algunos tumores malignos humanos, el uso de estrategias citorreductoras para el meduloblastoma y el astrocitoma maligno ha tenido un éxito limitado debido a la inaccesibilidad del tumor primario, a la pronta diseminación de las células malignas al líquido cefalorraquídeo, a la falta de agentes citorreductores eficaces o a toxicidad inaceptable. Por tanto, existe una necesidad de tratamientos satisfactorios para tumores del SNC que superen las anteriores desventajas de la terapia citorreductora convencional.

Además, ahora se acepta el vínculo entre los problemas con el metabolismo lipídico y las cardiopatías. Por tanto, es deseable encontrar un tratamiento capaz de modular o alterar el metabolismo lipídico en sujetos con enfermedades relacionadas. En particular son altamente deseables los tratamientos y procedimientos para disminuir los triglicéridos séricos.

Aunque la terapia con radiación se ha usado ampliamente en el tratamiento de la enfermedad neoplásica, está limitada por la falta de radiosensibilidad de regiones específicas de los tumores malignos. La potenciación química de

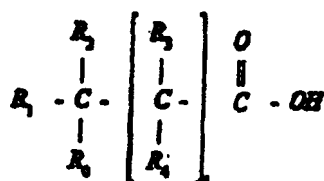
la sensibilidad de los tumores a la radiación en gran medida no ha sido exitosa y continúa siendo un problema crítico en la radioterapia. Por tanto, existe una necesidad de procedimientos mejorados que incluyan radioterapia.

En consecuencia, la presente invención se refiere a medios y composiciones para tratar las patologías que se han mencionado anteriormente y otras con PAA y sus sales, derivados y análogos farmacéuticamente aceptables.

III. Sumario de la invención

La invención se refiere a medios para tratar diversas patologías en un sujeto. La invención también se refiere a la modulación de diversas actividades celulares en un sujeto. La presente invención se refiere a medios para tratar diversos trastornos, incluyendo afecciones neoplásicas, en un sujeto que comprenden administrar una cantidad terapéutica de un derivado de ácido fenilacético de la fórmula:

Estructura General A



en la que:

R_0 = arilo, fenoxi, arilo sustituido o fenoxi sustituido;

R_1 y R_2 = H, alcoxi inferior, alquilo inferior de cadena recta y ramificada o halógeno;

R_3 y R_4 = H, alcoxi inferior, alquilo inferior de cadena recta y ramificada o halógeno;

y

n = un número entero de 0 a 2;

sales del mismo; estereoisómeros del mismo y mezclas del mismo. Esta estructura general se denomina en este documento en lo sucesivo Estructura General A sin referencia a ningún uso o composición particular. Las afecciones neoplásicas que se pueden tratar mediante este procedimiento incluyen neuroblastoma, leucemia promielocítica aguda, mielodisplasia aguda, glioma agudo, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, meduloblastoma, carcinoma de pulmón, astrocitoma y linfoma de Burkitt así como otras afecciones. Los compuestos para el anterior uso (como se describe en la Estructura General A) y para cualquiera de los usos y las composiciones descritos en este documento, incluyen específicamente fenilacetato sódico y fenilbutirato sódico.

Adicionalmente se describen medios para prevenir una afección neoplásica en un sujeto que comprenden administrar una cantidad profiláctica de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A. Estos medios también incluyen un uso en el que el compuesto se administra en combinación con un agente antineoplásico. La presente invención también proporciona medios para inducir la diferenciación de una célula que comprende administrar a la célula una cantidad inductora de diferenciación de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A.

La presente invención también se refiere a medios para controlar la biodisponibilidad de un compuesto de la Estructura General A. Esto se puede aplicar para el tratamiento de una patología no asociada a hemoglobina y comprende administrar a un sujeto el compuesto y medir el nivel de hemoglobina fetal, indicando un aumento de la cantidad de hemoglobina fetal una biodisponibilidad aumentada del compuesto para tratar la patología e indicando una disminución de la cantidad de hemoglobina fetal una disminución de la biodisponibilidad del compuesto para tratar la patología. Este método es útil para controlar una patología que es una afección neoplásica.

Adicionalmente se describen medios para tratar una afección neoplásica en un sujeto resistente a radiación y a quimioterapia que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A. Esto es particularmente útil para el tratamiento de una afección neoplásica que muestra el fenotipo de multirresistencia a fármacos.

Adicionalmente se describe lo siguiente:

Medios para tratar una afección neoplásica en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéutica de un retinoide en combinación con una cantidad terapéutica de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A. El retinoide puede ser ácido todo-*trans*-retinoico o ácido 9-*cis*-retinoico. Además, esto se puede usar para tratar afecciones neoplásicas tales como neuroblastoma. Varias afecciones neoplásicas que se pueden tratar mediante estos medios incluyen, pero sin limitación, neuroblastoma, leucemia promielocítica aguda, mielodisplasia aguda, glioma agudo, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, meduloblastoma y linfoma de Burkitt.

La presente invención también se refiere a medios para tratar una afección neoplásica en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéutica de un flavonoide en combinación con una cantidad terapéutica de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A. Los flavonoides adecuados incluyen apigenina y quercetina. Estos medios se pueden usar para tratar afecciones neoplásicas incluyendo carcinoma prostático.

En otra realización, la presente invención se refiere a medios para modular el metabolismo lipídico en un sujeto, que comprenden administrar una cantidad terapéutica de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A. La presente invención se refiere a medios para disminuir los triglicéridos séricos en un sujeto, que comprenden administrar una cantidad terapéutica de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A.

La presente invención describe medios para tratar localmente una afección neoplásica de un tejido interno de un sujeto, que comprende administrar, por vía intravesical, una cantidad terapéutica de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A. Estos medios se pueden usar para tratar localmente afecciones neoplásicas de orificios internos y de vejigas accesibles desde el exterior. Por tanto, el procedimiento intravesical se puede usar para tratar afecciones neoplásicas tales como carcinoma de vejiga y cáncer de riñón.

La presente invención proporciona un medio para sensibilizar un sujeto a terapia con radiación, que comprende administrar una cantidad terapéutica de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A. La presente invención también prevé el uso de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A en combinación con agentes que interaccionan con receptores de retinoides y el uso de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A como agente sensibilizante o protector frente a radiación o quimioterapia basado en radicales libres.

Un producto adicional para el uso simultáneo, separado o secuencial al tratar una afección neoplásica en un sujeto, comprende, en preparaciones separadas, una cantidad terapéutica de un retinoide y una cantidad terapéutica de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A. Esta composición se puede producir con retinoides incluyendo el ácido *todo-trans*-retinoico y el ácido *9-cis*-retinoico (o ambos).

La presente invención describe adicionalmente una composición que comprende una cantidad terapéutica de un retinoide y una cantidad terapéutica de un derivado de ácido fenilacético de la Estructura General A.

IV. Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra concentraciones séricas de PA y PAG y concentraciones plasmáticas de glutamina después de un bolo i. v. de 150 mg/kg de PA durante 2 horas.

La Figura 2 muestra los cambios dependientes del tiempo de proliferación celular y producción de Hb. Se añadió NaPA (5 mM) los días 2, 4, 6 y 8 de cultivos de fase II obtenidos de donantes normales y las células se analizaron el día 13. Panel A: Número de células que contienen Hb por ml ($\times 10^{-4}$) y las cantidades de Hb (pg) por célula (HCM). Panel B: Hb total (pg) por ml de cultivo y la proporción de HbF en la Hb total (% de HbF). Los puntos de datos representan la media de cuatro determinaciones. La desviación de los resultados de cada determinación con respecto a la media no superó el 10%. El NaPB a 2,5 mM produjo efectos comparables (no mostrado). En todos los casos, la viabilidad celular fue superior al 95%.

La Figura 3 muestra el efecto del NaPA en las proporciones de las muestras de Hb en precursores cultivados de eritrocitos obtenidos de un paciente con anemia falciforme. Se añadió NaPA a cultivos de fase II de 7 días. Las células se recogieron y lisaron el día 13 y se determinaron las proporciones de HbF, HbA₂ y HbS después de la separación por HPLC de intercambio catiónico.

La Figura 4 muestra la expresión potenciada de los antígenos de superficie W6/32 (CPH de clase I), DR (CPH de clase II) e ICAM-1 en células de melanoma tratadas con NaPB. Se trataron células 1011 de melanoma con PB 2 mM durante 10 días. El tratamiento se interrumpió durante 3 días para documentar la estabilidad del efecto. El análisis FACS mostró una expresión marcadamente aumentada de los antígenos después del tratamiento (área sombreada); la expresión de los antígenos de superficie el día 13 fue similar o ligeramente superior al día 10, indicando que el PB había inducido la diferenciación terminal.

La Figura 5 muestra la activación del Receptor por el Proliferador de Peroxisomas (PPAR) por PA, PB y diversos análogos del ácido fenilacético. La activación se mide por la producción aumentada del gen indicador de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) que está controlado por el elemento de respuesta para acil-CoA oxidasa, con respecto al control (C). Los detalles experimentales para este procedimiento de medición de activación se pueden encontrar en Sher y col., Biochem., 32(21):5598 (1993). La concentración (en mM) de un fármaco particular se indica a continuación los siguientes símbolos para los diversos fármacos: CF = clofibrato, PA = fenilacetato, CP = clorofenilacetato, PB = fenilbutirato, CPB = clorofenilbutirato, PAG = fenilacetilglutamina, IPB = yodofenilbutirato, B = butirato, IAA = ácido indol acético, NA = naftilacetato, PP = ácido fenoxipropiónico, 2-4D = 2,4-diclorofenoxi acetato.

La Figura 6 muestra la modulación de las actividades de glutatión (GSH), gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT) y catalasa por el fenilbutirato. La capacidad antioxidante (mM o unidades/mg de proteína) de las enzimas se midió hasta aproximadamente 100 horas después del tratamiento de células PC3 prostáticas con NaPB 2 mM.

La Figura 7 muestra la radiosensibilización de células U87 de glioblastoma humano por PA y PB mediante el tratamiento previo durante 72 horas con PA 1, 3 y 5 mM y PB 2,5 mM antes de la exposición a radiación ionizante (radiación γ de Co^{60}).

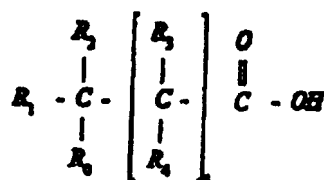
La Figura 8 muestra la relación entre lipofilicidad y citostasis inducida por derivados del fenilacetato en células de carcinoma prostático y en plantas. Los valores de $\log 1/\text{CI}_{50}$ para células prostáticas (calculados a partir de los datos presentados en la Tabla 14), se compararon con $1/\text{IC}_5$ para el desarrollo rápido de tejidos vegetales. Los compuestos ensayados, enumerados en un orden creciente de sus CLOGP, incluyeron 4-hidroxi-PA, PA, 4-fluoro-PA, 3-metil-PA, 4-metil-PA, 4-cloro-PA, 3-cloro-PA y 4-yodo-PA.

La Figura 9 muestra la inversión fenotípica inducida por fenilacetato y derivados seleccionados. Las células PC3 prostáticas malignas se trataron como se describe en "Material y Procedimientos". Los datos indican la relativa potencia de los compuestos ensayados al inhibir de forma significativa la independencia de anclaje de PC3 (A) y bloquear completamente la invasión de matrigel (B). El fenilacetato y los análogos se presentan en un orden creciente de CLOGP (de arriba hacia abajo). Los valores de CLOGP se proporcionan en las Tablas 14 y 15. El efecto en la dependencia de anclaje se confirmó con células U87 (no mostrado).

La Figura 10 muestra la potenciación de agentes antitumorales por NaPA.

V. Descripción detallada de la invención

Como se usa en este documento, la expresión "derivado de ácido fenilacético" (o "análogo de ácido fenilacético") se refiere a un compuesto de la fórmula:



en la que

R_0 es arilo (por ejemplo, fenilo, naftilo), fenoxi, arilo sustituido (por ejemplo, uno o más halógenos [por ejemplo, F, Cl, Br, I], alquilo inferior [por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo] o sustituyentes hidroxilo) o fenoxi sustituido (por ejemplo, uno o más halógenos [por ejemplo, F, Cl, Br, I], alquilo inferior [por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo] o sustituyentes hidroxilo);

R_1 y R_2 son cada uno H, alcoxi inferior (por ejemplo, metoxi, etoxi), alquilo inferior de cadena recta y ramificada (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo) o halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br, I);

R_3 y R_4 son cada uno H, alquilo inferior de cadena recta y ramificada (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo), alcoxi inferior (por ejemplo, metoxi, etoxi) o halógeno (por ejemplo, F, Cl, Br, I);

y

n es un número entero de 0 a 2;

sales del mismo (por ejemplo, Na^+ , K^+ u otras sales farmacéuticamente aceptables), estereoisómeros del mismo; y mezclas del mismo.

Cuando n es igual a 2, cada uno de los dos sustituyentes R_3 y cada uno de los dos sustituyentes R_4 pueden variar independientemente en la anterior definición de derivado de ácido fenilacético. Se pretende que esta definición incluya ácido fenilacético (PAA) y ácido fenilbutírico (PBA). Se pretende que las mezclas de acuerdo con esta definición incluyan mezclas de sales de ácido carboxílico, por ejemplo, una mezcla de fenilacetato sódico y fenilacetato potásico. Dado que la parte carboxílica de estos compuestos es una parte principalmente activa, se pretende que las referencias en este documento a un carboxilato, tal como fenilacetato (PA) o fenilbutirato (PB), también se refieran a un contracción apropiado, tal como Na^+ , K^+ u otro catión farmacéuticamente aceptable tal como un catión orgánico (por ejemplo, arginina). Por tanto, como se usa en este documento, un derivado o análogo de PA o PB se refiere a los derivados de ácido fenilacético de esta definición. Algunos de estos derivados se pueden interconvertir cuando están presentes en un sistema biológico. Por ejemplo, el PA se puede convertir enzimáticamente en PB en un animal y, de forma similar, el PB se puede convertir en PA.

Por tanto, los derivados de ácido fenilacético incluyen, sin limitación, ácido fenilacético, ácido fenilpropiónico, ácido fenilbutírico, ácido 1-naftilacético, ácido fenoxiacético, ácido fenoxipropiónico, ácido fenoxibutírico, ácido 4-clorofenilacético, ácido 4-clorofenilbutírico, ácido 4-yodofenilacético, ácido 4-yodofenilbutírico, ácido α -metilfenilacético, ácido α -metoxifenilacético, ácido α -etilfenilacético, ácido α -hidroxifenilacético, ácido 4-fluorofenilacético,

ácido 4-fluorofenilbutírico, ácido 2-metilfenilacético, ácido 3-metilfenilacético, ácido 4-metilfenilacético, ácido 3-clorofenilacético, ácido 3-clorofenilbutírico, ácido 2-clorofenilacético, ácido 2-clorofenilbutírico y ácido 2,6-diclorofenilacético y las sales sódicas de estos compuestos.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía intravenosa, por vía enteral, por vía parenteral, por vía intramuscular, por vía intranasal, por vía subcutánea, por vía tópica, por vía intravesical o por vía oral. Las cantidades de dosificación se basan en las concentraciones inhibitoras eficaces observadas *in vitro* e *in vivo* en estudios de antitumorigenicidad. La utilidad variada y eficaz de los compuestos de la presente invención se ilustra adicionalmente por las observaciones de que los mismos también se pueden administrar concomitantemente o en combinación con otros agentes antitumorales (tal como hidroxiurea, 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina y suramina), retinoides; hormonas; modificadores de la respuesta biológica (tales como interferón y factores del crecimiento hematopoyéticos); y la quimioterapia y terapia por radiación convencionales o diversas combinaciones de los mismos.

Se entiende que los medios y las composiciones de esta invención se pueden usar para tratar sujetos animales, incluyendo sujetos humanos.

Como se usa a lo largo de esta solicitud, la expresión “en combinación con” se refiere al tratamiento con los fármacos constituyentes de la combinación de forma simultánea o a intervalos tales que los fármacos están activos simultáneamente en el cuerpo. Además, como se usa en este documento, la expresión “cantidad terapéutica” se refiere a una cantidad de un agente, fármaco u otro compuesto de la clase genérica que es adecuada para el uso reivindicado. Por lo tanto, “cantidad terapéutica” excluye los miembros de la clase que no tienen la actividad mencionada.

Como se usa en este documento, los términos “retinoide” o “retinoides” incluyen cualquier miembro adecuado de la clase genérica incluyendo, pero sin limitación: ácido 9-*cis*-retinoico y ácido todo-*trans*-retinoico. La terapia de combinación con retinoide es adecuada para el tratamiento de cánceres incluyendo cáncer de mama, leucemia y melanoma maligno.

Como se usa en este documento, los inhibidores de la vía del mevalonato incluyen compuestos tales como terpenos y vastatinas. Las vastatinas adecuadas incluyen lovastatina. Los terpenos adecuados incluyen limoneno y sus análogos.

Los bioflavonoides son una clase de compuestos también conocidos como el complejo de vitamina P, y se conocen por su influencia en la fragilidad capilar (hemostática). Se conoce de forma general que disminuyen la permeabilidad y la fragilidad capilar. Como se usa en este documento, los flavonoides incluyen apigenina y quercetina. Sin embargo, se supone que otros flavonoides provocarían una utilidad similar.

La actividad particular de cada uno de los compuestos se puede identificar utilizando los ensayos y modelos descritos en los Ejemplos.

Como se usa en este documento, “que modulan el metabolismo lipídico” describe la capacidad de una terapia para alterar la producción y la degradación de lípidos *in vivo*. Por ejemplo, una modulación del metabolismo lipídico es la disminución de triglicéridos séricos (el nivel de lipoproteínas de baja y alta densidad en el suero de un sujeto), es decir, la disminución del nivel de colesterol de un sujeto.

VI. Ejemplos

Los ejemplos presentados en este documento, incluyendo los experimentos, proporcionan procedimientos para ilustrar, sin ninguna limitación implícita, la práctica de esta invención centrada en el ácido fenilacético y sus derivados dirigidos a: A. El uso de ácido fenilacético y sus derivados en el tratamiento o la prevención de cáncer; F. Medios para controlar el nivel de dosificación del ácido fenilacético y sus derivados en un paciente y/o la respuesta del paciente a estos fármacos; G. La activación del PPAR por el ácido fenilacético y sus derivados; H. El uso de ácido fenilacético y sus derivados en el tratamiento de cánceres que tienen un fenotipo multirresistente a fármacos; I. Ácido fenilacético y sus derivados, correlación entre potencia y lipofiliidad; O. Ácido fenilacético y sus derivados en estudios humanos relacionados con tratamientos con PA y PB; P. Ácido fenilacético y sus derivados en procedimientos para alterar el metabolismo lipídico, incluyendo disminuir triglicéridos séricos; Q. Inducción de HbF por el ácido fenilacético y sus derivados en células malignas y no malignas; y R. Modos de administrar el ácido fenilacético y sus derivados.

Sección A

Uso de ácido fenilacético y sus derivados en el tratamiento o la prevención de cáncer

Como se ha discutido en este documento, el NaPA y el NaPB afectan al crecimiento tumoral *in vitro* y en modelos animales a concentraciones farmacológicas, no tóxicas. Estos ácidos grasos aromáticos inducen citostasis y promueven la maduración de diversas células humanas malignas, incluyendo carcinoma prostático resistente a hormonas, glioblastoma, melanoma maligno y carcinoma de pulmón. Los marcados cambios en la biología tumoral se asociaron a alteraciones en la expresión de genes implicados en el crecimiento, la invasión, la angiogénesis y la inmunogenicidad del tumor. Parece que están implicados múltiples mecanismos de acción de los fármacos. Estos mecanismos incluyen (a) modificación del metabolismo lipídico, (b) regulación de la expresión génica por hipometilación del ADN y acti-

vacación transcripcional y (c) inhibición de isoprenilación de proteínas. Los ensayos clínicos de Fase I confirmaron la eficacia de estos nuevos inductores de la diferenciación no tóxicos.

Se ha demostrado que las composiciones farmacéuticas que contienen derivados de ácido fenilacético provocan la inversión de la malignidad e inducen la diferenciación de las células tumorales. Por ejemplo, para demostrar la capacidad de los fármacos para inducir la diferenciación de células tumorales, se usaron diferentes sistemas de modelo de diferenciación *in vitro* e *in vivo*. Un primer sistema usado fue una línea celular HL-60 de leucemia promielocítica humana. Esta línea celular representa células precursoras no comprometidas que se pueden inducir a diferenciarse finalmente a lo largo del linaje mieloide o monocítico. En un segundo sistema se usaron células C3H 10T1/2 mesenquimales embrionarias inmortalizadas que tienen la capacidad de diferenciarse en miocitos, adipocitos o condrocitos. En un tercer sistema se usaron células K562 de eritroleucemia humana debido a que se pueden inducir para producir hemoglobina. Los experimentos *in vivo* demuestran la eficacia del NaPA para inducir la diferenciación terminal en seres humanos y animales.

Ejemplo 1

Interrupción del crecimiento en gliomas malignos

Además, el fenilacetato se ha implicado en las lesiones en el cerebro inmaduro en el caso de fenilcetonuria. Debido a las similitudes en el patrón de crecimiento y el metabolismo entre el cerebro que se desarrolla de forma normal y los tumores malignos del sistema nervioso central, el fenilacetato puede ser perjudicial para algunos cánceres cerebrales. El fenilacetato puede inducir citostasis la inversión de las propiedades malignas de células cultivadas de glioblastoma humano cuando se usa a concentraciones farmacológicas que se toleran bien por niños y adultos. De forma interesante, las células tumorales tratadas mostraron alteraciones bioquímicas similares a las observadas en situaciones similares a la fenilcetonuria, incluyendo la disminución selectiva en la síntesis del colesterol *de novo* a partir del mevalonato. Dado que los gliomas, pero no las células cerebrales normales maduras, dependen en gran medida del mevalonato para producir esteroides e isoprenoides vitales para el crecimiento celular, se espera que el fenilacetato afectara el crecimiento tumoral *in vivo*, mientras que se conservarían los tejidos normales. El tratamiento sistémico de ratas que tienen gliomas intracraneales dio como resultado una supresión significativa del tumor sin toxicidad aparente para el huésped. Los datos experimentales, que son consistentes con la evidencia clínica de actividad selectiva contra cerebro indiferenciado, sugieren que el fenilacetato puede ofrecer un nuevo enfoque seguro y eficaz para el tratamiento de gliomas malignos.

La experiencia clínica, obtenida durante el tratamiento con fenilacetato de niños con trastornos del ciclo de la urea, indica que se pueden lograr niveles milimolares sin efectos adversos significativos. La falta de neurotoxicidad en estos pacientes, sin embargo, guarda un marcado contraste con lesión cerebral grave documentada en fenilcetonuria (PKU), un error congénito del metabolismo de la fenilalanina asociado a la producción excesiva de fenilacetato, microcefalia y retraso mental. [Scriber, C. R. y C. L. Clow, 1980. Phenylketonuria: epitome of human biochemical genetics. New Engl. J. Med. 303:1394-1400]. Las diferencias en los resultados clínicos se pueden explicar por el hecho de que, aunque el fenilacetato cruza fácilmente la barrera hematoencefálica, barrera tanto de la vida prenatal como postnatal, la neurotoxicidad está limitada al cerebro inmaduro. El fenómeno del "síndrome de PKU materna" proporciona evidencia convincente de una ventana de susceptibilidad restringida por el desarrollo: las mujeres con PKU que se diagnostican de forma temprana y se mantienen con una dieta con restricción de fenilalanina, se desarrollan normalmente y posteriormente toleran una dieta normal. Estas mujeres a menudo dan a luz niños genéticamente normales, aunque mentalmente retrasados debido a la PKU materna no tratada. Los niveles elevados de fenilacetato circulante, aunque no afectan a los tejidos maduros de la madre, son perjudiciales para el cerebro fetal. Los cambios patológicos primarios en la PKU implican el rápido desarrollo de células gliales y están caracterizados por alteraciones en el metabolismo lipídico y la mielinización con disfunción neuronal posterior. Los tejidos gliales fetales vulnerables se asemejan a células gliales neoplásicas en numerosos aspectos moleculares y bioquímicos, incluyendo una dependencia única del metabolismo del mevalonato (MVA) para la síntesis de esteroides e isoprenoides críticos para la replicación celular [Kandutsch, A. A. y S. E. Saucier. 1969. Regulation of sterol synthesis in developing brains of normal and jimpy mice. Arch. Biochem. Biophys. 135: 201-208; Fumagalli, R, E. Grossi, P Paoletti y R. Paoletti. 1964. Studies on lipids in brain tumors. I. Occurrence and significance of sterol precursors of cholesterol in human brain tumors. J. Neurochem. 11: 561-565; Grossi, E., P. Paoletti y R. Paoletti. 1958. An analysis of brain cholesterol and fatty acid biosynthesis. Arch. Int. Physiol. Biochem. 66: 564-572], y de la glutamina circulante como donadora de nitrógeno para la síntesis de ADN, ARN y proteínas [Perry, T. L., S. Hasen, B. Tischler, R. Bunting y S. Diamond. 1970. Glutamine depletion in phenylketonuria, a possible cause of the mental defect. New Engl. J. Med. 282: 761-766; Weber, G. 1983. Biochemical strategy of cancer cells and the design of chemotherapy: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. Cancer Res. 43: 3466-3492]. La hipótesis subyacente a estos estudios fue que el fenilacetato, conocido por conjugar y agotar la glutamina sérica en seres humanos, e inhibir la vía del MVA en el cerebro inmaduro [Castillo, M., M. F. Zafra y E. García-Peregrin. 1988. Inhibition of brain and liver 3-hydroxy-3-methylgluteryl-CoA reductase and mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase in experimental hyperphenylalaninemia. Neurochem. Res. 13: 551-555; Castillo, M., J. Iglesias, M. F. Zafra y E. García-Peregrin. 1991. Inhibition of chick brain cholesterologenic enzymes by phenyl and phenolic derivatives of phenylalanine. Neurochem. Int. 18: 171-174; Castillo, M., M. Martinez-Cayuela, M. F. Zafra y E. García-Peregrin. 1991. Effect of phenylalanine derivatives on the main regulatory enzymes of hepatic cholesterologenesis. Mol. Cell. Biochem. 105: 21-25], podría atacar estos puntos de control críticos en los gliomas malignos. La eficacia del fenilacetato se demostró usando modelos de tumor tanto *in vitro* como *in vivo*.

Cultivos Celulares y Reactivos. Se adquirieron líneas de células de glioblastoma humano en la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) y se mantuvieron en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, antibióticos y L-glutamina 2 mM, a menos que se especifique de otro modo. D. Grant y H. Kleinman (NIH, Bethesda, MD) proporcionaron células endoteliales de vena umbilical humana, aisladas de cordones recientemente obtenidos. Elan Pharmaceutical Corporation (Gainseville, GA) proporcionó sales sódicas de ácido fenilacético y ácido fenilbutírico. La fenilacetilglutamina fue un obsequio de S. Brusilow (Johns Hopkins, MD).

Evaluación de la Replicación y Viabilidad Celular. Las tasas de crecimiento se determinaron por un ensayo enzimático usando bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (Sigma, St. Louis, MO) [Alley, M. C., D. A. Scudiero, A. Monks, M. L. Hursey, M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbott, J. G. Mayo, R. H. Schoemaker y M. R. Boyd. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a micro-culture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48: 589-601], siguiendo la enumeración de células con un hemocitómetro después de la separación con tripsina/EDTA y mediante la incorporación de timidina en el ADN. Los diferentes ensayos produjeron esencialmente los mismos resultados. La viabilidad celular se evaluó mediante exclusión con azul tripano.

Formación de Colonias en Agar Semi-Sólido. Las células tumorales se separaron con tripsina/EDTA, se resuspendieron en medio de cultivo que contenía agar al 0,36% y se colocaron sobre una capa base de agar sólido (al 0,9%) en presencia o ausencia de fármacos. Las colonias compuestas por 30 o más células se puntuaron después de tres semanas.

Inmunocitoquímica. Se inmunotñieron las células con anticuerpos monoclonales anti-vimentina usando el Dako PAP kit K537 (Dako Corporation, CA).

Medición de la Síntesis de Colesterol, Proteínas y ADN. Para los estudios sobre la síntesis de esteroides se marcaron las células durante 24 horas con 5×10^6 de DPM [$5\text{-}^3\text{H}$]-mevalonato (35 Ci/mmol) (New England Nuclear, Boston, MA) en medio de un cultivo que contenía lovastatina $3 \mu\text{M}$ y 0,5 mM de mevalonato no marcado, en presencia o ausencia de fenilacetato 5 mM o fenilbutirato 2,5 mM. Los esteroides celulares se extrajeron con hexano y se separaron mediante cromatografía en capa fina de sílice. El R_f del producto radiomarcado soluble en hexano fue idéntico al de un patrón de colesterol radiomarcado en tres sistemas de disolvente diferentes. Se ensayaron células tratadas de forma similar para la síntesis proteica y de ADN *de novo* por marcado metabólico con [^3H]-leucina (158 Ci/mmol) o [^3H]-desoxitimidina (6,7 Ci/mmol) (New England Nuclear). Las mediciones de $^{14}\text{CO}_2$ liberado de [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-mevalonato (49,5 mCi/mmol) (Amersham, Chicago, IL) en homogenados celulares incubados con fenilacetato/fenilbutirato se realizaron con modificaciones menores en los procedimientos establecidos.

Análisis de la Isoprenilación de Proteínas. Se incubaron cultivos celulares con fenilacetato 10 mM o fenilbutirato 2,5 mM durante 24 horas en medio de cultivo completo y se marcaron con RS- $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -mevalonato ($16 \mu\text{Ci/ml}$, actividad específica $15 \mu\text{Ci/mmol}$) (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO) durante las 15 horas finales de tratamiento. Se extrajeron proteínas celulares completas, se procesaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y se tiñeron con Azul Brillante de Commassie. Después se secaron los geles y se expusieron a una película X-Omat de Kodak durante 4 días.

Estudios en Animales. Para determinar el efecto de fenilacetato en el fenotipo tumorigénico de células de glioblastoma humano, se pretrataron cultivos durante una semana y después se recogieron, se resuspendieron en medio que contenía matrigel al 30% (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) y se trasplantaron s. c. ($2,5 \times 10^6$ células por sitio) en ratones atímicos hembras de 5 semanas de edad (Division of Cancer Treatment, NCI Animal Program, Frederick Cancer Research Facility). Después se observaron los animales para crecimiento de tumor en el sitio de inyección. Para evaluar adicionalmente la eficacia del fármaco *in vivo*, ratas Fisher 344 recibieron una inoculación estereotáxica de células de gliosarcoma 9L singénicas (4×10^4) en la materia blanca profunda del hemisferio cerebral derecho, como se ha descrito previamente [Weizsaecker, M., D. F., Deen, M. L. Rosenblum, T. Hoshino, P. H. Gutin y M. Baker. 1981. The 9L rat brain tumor: description and application of an animal model. *J. Neurol.* 224: 183-192; Culver, KW., Z. Ram, S. Walbridge, H. Ishii, E. H. Oldfield y R. M. Blaese. 1992. *In vivo* gene transfer with retroviral vector producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science.* 256: 1550-1552]. Después, los animales se sometieron a dos semanas de tratamiento continuo con fenilacetato sódico (550 mg/kg/día, s. c.), usando minibombas osmóticas transplantadas por vía subcutánea. En ratas de control, las minibombas se llenaron con solución salina. Los análisis estadísticos de los datos emplearon el Ensayo Exacto de Fisher.

Inducción de citostasis e inversión fenotípica en células de glioblastoma humano cultivadas. El tratamiento de células de glioblastoma con fenilacetato dio como resultado la interrupción del crecimiento dependiente del tiempo y la dosis, acompañado por una síntesis disminuida de forma similar del ADN. Después de 4 a 6 días de tratamiento continuo con fenilacetato 4 mM había una inhibición del crecimiento de aproximadamente el 50% en los cultivos de U87, A172, U373, U343 y HS683 (CI_{50} $4,4 \pm 0,6$ mM). Reflejando la naturaleza heterogénea de las respuestas de células tumorales, las células U251 y U138 de glioblastoma fueron menos sensibles con valores de CI_{50} de 8-10 mM. Otros estudios, que imitaban las condiciones farmacológicas esperadas en pacientes, implicaron la exposición de las células a fenilacetato en un medio desprovisto de glutamina. Estas condiciones bloquearon completamente el crecimiento de las células de glioblastoma, pero tuvieron poco efecto en la replicación de células endoteliales normales. El fenilbutirato, un metabolito intermedio del fenilacetato formado en el cerebro mediante la prolongación de ácidos

grasos, también inhibió la replicación de células tumorales (CI_{50} $2,2 \pm 0,2$ mM en A172, U87 y U373), mientras que el metabolito final, fenilacetilglutamina, fue inactivo. Además de inducir la citostasis tumoral selectiva, tanto el fenilacetato como el fenilbutirato promovieron la maduración celular y la inversión a un fenotipo no maligno, manifestado por un patrón alterado de filamentos intermedios del citoesqueleto, pérdida de la independencia de anclaje y tumorigenicidad reducida en ratones atímicos (Tabla 1). Estos cambios profundos en el comportamiento del tumor estuvieron acompañados por alteraciones en la expresión de genes implicados en el control del crecimiento, la angiogénesis y la inmunosupresión (por ejemplo, $TGF\alpha$, HbF y $TGF-\beta R2$).

TABLA 1

Inversión de la Malignidad de Células de Glioblastoma Humano

Tratamiento	Clonogenicidad en Agar Blando ¹ (%)		Incidencia del Tumor ²
			Sitios positivos/inyectados
Ninguno	8,1		9/10
Fenilacetato	2,5 mM	0,5	ND
	5 mM	>0,01	2/10
Fenilbutirato	1,25 mM	0,15	ND
	2,5 mM	>0,01	1/10

¹Las células U87 se separaron con tripsina/EDTA, se resuspendieron en medio de cultivo que contenía agar al 0,36% y se colocaron sobre una capa base de agar sólido (al 0,9%) en presencia o ausencia de fármacos. Después de tres semanas se puntuaron las colonias compuestas por 30 células o más.

²Las células U87 pretratadas en cultivo durante una semana, se recogieron, se resuspendieron en medio que contenía matrigel al 30% y se transplantaron s. c. en ratones atímicos hembra de 5 semanas de edad ($2,5 \times 10^6$ células por ratón). Los datos se registraron 5 semanas después de la inoculación de células.

ND = No determinado.

El fenilacetato inhibe la vía del mevalonato y la isoprenilación de proteínas. El cambio bioquímico más consistente observado en células gliales expuestas a fenilacetato implicó alteraciones en el metabolismo lipídico e inhibición de la vía del MVA. La síntesis *de novo* activa de colesterol e isoprenoides a partir de precursores tales como acetil-CoA y MVA es una característica importante del cerebro en desarrollo (pero del cerebro maduro), coincidiendo con la mielinización. También es el distintivo de gliomas malignos [Azarnoff, D. L., G. L. Curra y W. P. Williamson. 1958. Incorporation of acetate-1-14C into cholesterol by human intracranial tumors *in vitro*. J. Nat. Cancer Inst. 21: 1109-1115; Rudling, M.J., B. Angelin, C. O. Peterson y V.P. Collins. 1990. Low density lipoprotein receptor activity in human intracranial tumors and its relation to cholesterol requirement. Cancer Res. 50 (supl): 483-487]. La producción de colesterol y la isoprenilación de proteínas disminuyeron en el espacio de 24 horas del tratamiento del glioblastoma con fenilacetato o fenilbutirato, precediendo a cambios en la síntesis de ADN y de proteínas totales, que fueron detectables después de 48 horas. La disminución de la isoprenilación fue paralela a una disminución de la descarboxilación del MVA (hasta menos del 50% del control), un efecto observado previamente en cerebros embrionarios en condiciones similares a PKU. La MVA-5-pirofosfato descarboxilasa, una enzima clave que regula la síntesis de colesterol en el cerebro, se inhibe por fenilacetato en condiciones en las que la MVA quinasa y la MVA-5-fosfato quinasa solamente se ven mínimamente afectadas. El fenilacetato también puede interferir con la síntesis del MVA a partir de acetil-CoA. Las células de glioblastoma, sin embargo, no se pudieron rescatar por MVA exógeno (0,3-3 nM), sugiriendo que la utilización de MVA, más que su síntesis, es el objetivo principal.

El mevalonato es un precursor de varios restos isopentenilo requeridos para la progresión por el ciclo celular tales como esteroides, dolicol, las cadenas laterales de ubiquinona e isopenteniladenina y grupos prenilo que modifican un pequeño conjunto de proteínas críticas [Goldstein, J. L. y M. S. Brown. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. Nature, 343: 425-430; Marshall, C. J. 1993. Protein prenylation: A mediator of protein-protein interactions. Science. 259: 1865-1866; Braun, P. E., D. De Angelis, W. W. Shtybel y L. Bernier. 1991. Isoprenoid modification permits 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase to bind to membranes. J. Neurosci. Res. 30: 540-544]. El último incluye proteínas G de membrana plasmática y similares a G (por ejemplo, ras) implicadas en la transducción de señal mitógena (peso molecular 20-26 kDa), la enzima relacionada con la mielinización 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa y láminas de envuelta nuclear que juegan un papel clave en la mitosis (44-74 kDa). La inhibición de la síntesis de esterol e isoprenoide durante el desarrollo rápido del cerebro podría provocar la microcefalia y la mielinización alterada observadas en PKU no tratada. Se espera que dirigirse al MVA en gliomas malignos desdiferenciados, por otra parte, inhibiría el crecimiento tumoral *in vivo* sin lesionar los tejidos normales circundantes, ya que la vía del MVA es significativamente menos activa en el cerebro maduro.

Actividad de fenilacetato en gliomas experimentales en ratas. Para evaluar el efecto antitumoral *in vivo* del fenilacetato se inoculó a ratas Fisher una inyección intracerebral estereotáxica de células de gliosarcoma 9L singenéticas. Este modelo de tumor se conoce por su patrón de crecimiento agresivo que da como resultado aproximadamente el 100% de la mortalidad de las ratas en el intervalo de 3 a 4 semanas. Se administró continuamente fenilacetato mediante minibombas osmóticas subcutáneas implantadas para suministrar una dosis clínicamente posible de 550 mg/kg/día. El tratamiento sistémico durante dos semanas de ratas que llevaban células de glioma intracraneal suprimió de forma marcada el crecimiento del tumor ($p < 0,05$, Tabla 2) sin efectos adversos detectables. Estudios posteriores en animales de experimentación indican que el fenilacetato (niveles plasmáticos y en líquido cefalorraquídeo de 2-3 mM) induce la maduración de células tumorales *in vivo* y prolonga significativamente la supervivencia.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Actividad de Fenilacetato en Cáncer Cerebral Experimental

Tratamiento ¹	N° de animales	Tumores Cerebrales ²		
		Macroscópico	Microscópico	Sin Tumor
Solución Salina	10	8	1	1
Fenilacetato	15	3	4	8

¹ Las ratas Fisher 344 recibieron una inoculación estereotáxica de células de gliosarcoma 9L singenéticas en la materia blanca profunda del hemisferio cerebral derecho, como se describe en Material y Procedimientos. Los animales se sometieron después a dos semanas de tratamiento continuo de con fenilacetato sódico (550 mg/kg/día, s. c.) o solución salina, usando minibombas osmóticas transplantadas por vía subcutánea.

² Los animales se sacrificaron 23 días después de la inoculación del tumor para determinar los efectos antitumorales. Los hallazgos se confirmaron por evaluación histológica del sitio inoculado.

Resumen y Prospectiva. Durante mucho tiempo el fenilacetato ha estado implicado en la lesión del cerebro fetal en desarrollo. Debido a que los tumores primarios del sistema nervioso central son en gran medida reminiscentes del cerebro fetal inmaduro, los gliomas malignos deben ser igualmente vulnerables. Además, considerando el síndrome de PKU materna un modelo humano natural, se espera que el fenilacetato suprimiera el crecimiento de neoplasias cerebrales sin dañar los tejidos normales. Los datos experimentales apoyan esta hipótesis. El fenilacetato indujo la citostasis selectiva y promovió la maduración de células de glioma *in vitro* e *in vivo*. La interrupción prematura del crecimiento y la diferenciación también podrían subyacer a la lesión del cerebro fetal en la PKU. Están implicados múltiples mecanismos de acción, incluyendo la inhibición de la isoprenilación de proteínas y el agotamiento de glutamina plasmática en seres humanos. La actividad antitumoral demostrable, la falta de toxicidad y la facilidad de administración (vía oral o intravenosa) demuestran la eficacia de fenilacetato en el manejo de gliomas malignos y, tal vez, incluso de otras neoplasias. Previamente, el fenilacetato ha mostrado actividad en el cáncer de próstata *in vitro*. Los estudios clínicos de Fase I con fenilacetato en el tratamiento de adultos con cáncer confirmaron que se pueden lograr niveles terapéuticos en plasma y en líquido cefalorraquídeo sin toxicidades significativas y proporcionar evidencia preliminar del beneficio de pacientes con carcinoma prostático y glioblastoma.

El fenilacetato se usó para tratar tumores sólidos humanos, incluyendo carcinoma prostático, glioblastomas y melanoma maligno. El tratamiento dio como resultado la citostasis selectiva y la inversión fenotípica, como se indica por la dependencia de anclaje restaurada, una invasividad reducida y pérdida de tumorigenicidad en ratones atímicos. El análisis molecular de células de cáncer cerebral y de próstata resistente a hormonas mostró una notable disminución de la producción y secreción de TGF β , una proteína implicada en el control del crecimiento, la angiogénesis y la inmunosupresión. Las células prostáticas tratadas mostraron actividad proteolítica disminuida mediada por el activador del plasminógeno-uroquinasa, un marcador molecular de la progresión de la enfermedad en el hombre.

Ejemplo 2

Interrupción del crecimiento, maduración del tumor y supervivencia prolongada en tumores cerebrales tratados con NaPA

Estudios in vitro

Proliferación celular. El efecto del NaPA sobre la proliferación celular se evaluó usando un ensayo de incorporación de timidina tritiada en células de gliosarcoma 9L cultivadas y enumeración celular usando un hemocitómetro después de la separación con tripsina/EDTA. El 9L es un tumor glial maligno singéneico obtenido de ratas Fischer 344 asociado a una mortalidad del 100% en el intervalo de tres a cuatro semanas después de la inoculación intracerebral [Weizsaecker M, Deen DF, Rosenblum ML y col. The 9L rat brain tumor: description and application of an animal model. J. Neurol. 1981; 224: 183-192]. Las células tumorales se sembraron con 5×10^4 células tumorales/pocillo en placas de 24 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con suero fetal bovino al 10% (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT), L-glutamina 2 mM (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), 50 U/ml de penicilina (GIBCO) y 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin (GIBCO) y 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de Fungizone (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA). Después de 24 horas se cambió el medio y se añadió NaPA (Elan Pharmaceutical Research Corp., Gainesville, GA) al medio con una concentración de 2,5, 5 y 10 mM durante 5 días. Seis horas antes de la recogida se añadió a cada pocillo 0,5 mCi de timidina tritiada (ICN Radiochemicals, Irvine, CA). La incorporación de timidina se determinó por recuento de escintilación por triplicado.

Formación de colonias en agar semi-sólido. El crecimiento independiente del anclaje (la capacidad que de las células de formar colonias en agar semi-sólido) es característico de células de glioma maligno. Las células 9L se recogieron con tripsina/EDTA y se resuspendieron a $1,0 \times 10^4$ células/ml en medio de cultivo que contenía agar al 0,36% (Difco). Se añadieron dos ml de la suspensión celular a placas de 60 mm (Costar, Cambridge, MA) que se habían revestido previamente con 4 ml de agar sólido (al 0,9%). Se añadió fenilacetato al agar a diferentes concentraciones (0, 1,25, 2,5 y 5 mM). En un segundo experimento se dejaron crecer células 9L durante 7 días en cultivo tisular que contenía NaPA 5 mM. Después, las células se transfirieron, como se describe, a placas de agar sin NaPA. Después de 3 semanas se contaron las colonias compuestas por 30 células o más.

Inoculación de tumor cerebral 9L y administración de fenilacetato. Se anestesiaron ratas Fischer 344 (n = 50) con un peso de 230-350 gramos usando Ketamina intraperitoneal (i. p.) (90 mg/kg, Fort Dodge Laboratories, Inc., Fort Dodge, Iowa) y Xilazina (10 mg/kg, Mobay Corporation, Shawnee, Kansas) y se colocaron en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, California). Se inyectaron células de gliosarcoma 9L singénicas 4×10^4 en 5 μl de solución salina equilibrada (de Hank) en la materia blanca profunda (profundidad de inoculación - 3,5 mm) del hemisferio cerebral derecho utilizando una jeringa Hamilton de 10 μl conectada al brazo manipulador del aparato estereotáxico. Se administró fenilacetato a 10 ratas por liberación subcutánea (s. c.) continua del fármaco usando una velocidad de liberación de las dos bombas osmóticas 2ML2 de 5 $\mu\text{l/h}$ durante 14 días (Alza Corporation, Palo Alto, CA). El día de la inoculación de tumor se implantaron las bombas en el tejido subcutáneo de ambos flancos. La concentración del fármaco en las bombas fue 650 mg/ml (un total de 2600 mg para ambas bombas) para una dosis diaria de 550 mg/kg por rata. Las minibombas se sustituyeron después de 14 días para un tratamiento total de 28 días. Otras quince ratas recibieron NaPA, como se describe, comenzando 7 días después de la inoculación intracerebral del tumor. En estas ratas se administró una inyección diaria adicional de NaPA (300 mg/kg, i. p.) durante 28 días. Las ratas control (n = 25) recibieron solución salina continua por dos bombas osmóticas s. c. 2ML2. Todas las ratas recibieron penicilina perioperativa (100.000 u/kg, i. m.) antes de la implantación de las minibombas. Se registró la supervivencia en cada grupo. Tres ratas tratadas para tumores establecidos y dos ratas control se sacrificaron 7 días después del inicio de NaPA (14 días después de la inoculación del tumor). Estas se usaron para estudios por microscopía electrónica de los tumores tratados, ensayos de proliferación *in vivo* y la medición de niveles de NaPA en suero y LCR. Se extrajeron los órganos periféricos (corazón, pulmón, bazo, hígado, riñón, intestino, suprarrenal y gónadas) y se sometieron a un examen histológico rutinario. Las muestras cerebrales se cortaron y se tiñeron con tinciones rutinarias de hematoxilina y eosina (H & E) y mielina (azul Luxol rápido) para evidenciar toxicidad relacionada con el fármaco.

Microscopia electrónica. Los animales se sacrificaron por perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato sódico 0,1 M a pH 7,4. Dos horas después, los cerebros fijados se lavaron en tampón y se cortaron en secciones coronales de 1 mm de grosor. Las áreas que contenían tumores se diseccionaron adicionalmente en cubos de 1 mm³, se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio al 2% en tampón cacodilato sódico 0,1 M durante 2 horas, se lavaron en tampón, se sometieron a mordiente en bloque con acetato de uranilo al 1% a pH 5 durante una noche, después se lavaron, deshidrataron y embebieron en Epon. Se cortaron secciones delgadas a varios niveles en cada bloque para garantizar un muestreo más amplio. Se tomaron micrografías electrónicas de células tumorales al azar para morfología.

Ensayo de proliferación in vivo. Una rata tratada con NaPA y una tratada con solución salina recibieron una inyección i. p. de 9 mg/3 ml de BrdU (Amersham, Illinois) 14 días después de la inoculación del tumor y 7 días después del inicio del tratamiento. Dos horas más tarde, las ratas se sacrificaron y se extrajeron y seccionaron los cerebros. Se usaron anticuerpos monoclonales anti-BrdU de ratón para inmunotear los tejidos, que después se tiñeron con colorante de contraste con hematoxilina. Se enumeraron las células tumorales en campos de 10 aumentos en cada muestra de tumor y se registró el porcentaje de células que se tiñeron de forma positiva (indicando incorporación de BrdU durante la división celular activa).

Medición de niveles de NaPA en suero y LCR. Tres ratas tratadas con NaPA y 2 ratas tratadas con solución salina se sacrificaron 7 días después de la administración combinada s. c. e i. p. de NaPA o solución salina. Se extrajo sangre del corazón y se aspiró LCR de la cisterna magna. Debido a las limitaciones del volumen del LCR, se evaluaron muestras agrupadas de suero y LCR de manera similar. Se realizó la extracción de proteínas de una alícuota de 200 μ l de fluido biológico con 100 μ l de una disolución de ácido perclórico al 10%. Se neutralizaron 150 μ l de sobrenadante con 25 μ l de bicarbonato de potasio al 20% y se centrifugaron. Después se pipetearon 125 μ l de sobrenadante en tubos de muestreo. La cromatografía se realizó en un sistema de HPLC Wilson 715 utilizando una columna C18 de Waters de 30 cm (d. i. 3,9 mm) a 60°C. Un inyector de 75 μ l se eluyó con un gradiente de acetonitrilo/agua que variaba del 5 al 30% durante 20 minutos y que fluía a 1 ml/min. El control por UV se realizó a una longitud de onda de 20 nm. El tiempo de elución para el fenilacetato fue 14,8 minutos. *Análisis estadístico.* Se usó la prueba de Chi-cuadrado para comparar las proporciones de células positivas a BrdU. Se usó el ensayo de Mantel-Haenzel para comparar la supervivencia entre ratas tratadas con NaPA y las tratadas con solución salina en los experimentos de supervivencia.

Resultados in vitro

Efecto in vitro de NaPA en la proliferación celular y la dependencia de anclaje. El tratamiento de células 9L con NaPA durante 5 días dio como resultado una disminución dependiente de dosis del número de células con CI50 a 6,0 $\pm$ 0,5 mM. Esto se acompañó por una disminución de la incorporación de timidina tritiada. Además, el fenilacetato indujo una restauración dependiente de dosis la dependencia de anclaje, indicando una inversión del fenotipo maligno (Tabla 3). Las células 9L que se expusieron a NaPA durante 7 días antes de ser sembradas en placas de agar (que no contenían NaPA) todavía mostraron una inhibición > 40% en la formación de colonias (Tabla 3).

TABLA 3

El Fenilacetato Inhibe el Crecimiento Independiente de Anclaje de Células de Gliosarcoma 9L

Tratamiento en Cultivo	PA en Agar	Formación de Colonias	
		# de Colonias	% de Inhibición
ninguno	0	628 $\pm$ 50	-
ninguno	5	8 $\pm$ 4	98,7
	2,5	111 $\pm$ 13	82,4
	1,25	326 $\pm$ 20	48,0
^a Fenilacetato		375 $\pm$ 25	40,3
0			
^a Las células 9L se trataron con fenilacetato 5 mM en cultivo durante 7 días antes de sembrarse en agar blando.			

Estudios in vivo

Ensayo de proliferación In vivo y hallazgos de microscopía electrónica. El tratamiento de tumores cerebrales establecidos con NaPA dio como resultado una disminución significativa de la velocidad de proliferación. 285 de 1283 células tumorales tratadas teñidas para BrdU se compararon con 429 de 1347 células tumorales tratadas con solución salina (índice mitótico de 0,22 en tumores tratados con NaPA frente a 0,33 en tumores tratados con solución salina; p < 0,0001).

La microscopía electrónica de estos tumores mostró una sorprendente abundancia de retículo endoplásmico rugoso bien organizado en las células tumorales tratadas con NaPA, indicando un mayor grado de diferenciación celular [Ghadially FN. Endoplasmic reticulum and ribosomes in cell differentiation and neoplasia. In: eds. Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix. Third, London: Butterworths; 1992:450-454]. En contraste, los tumores no tratados generalmente tuvieron escaso retículo endoplásmico rugoso y numerosos polirribosomas, lo que son características de células altamente malignas. Además, se encontraron más frecuentemente células mitóticas en tumores no tratados.

Niveles séricos y en LCR del NaPA. Los ensayos de suero y LCR agrupados de 3 ratas tratadas y 2 de control, obtenidos después de 7 días de administración combinada s. c. e i. p. de NaPA (dosis diaria total de 850 mg/kg) o

solución salina, mostraron un nivel medio de fenilacetato de 2,45 mM en suero y 3,1 mM en LCR. En las muestras de suero o LCR de ratas tratadas con solución salina no se detectó fenilacetato.

Experimentos de supervivencia

Inoculación de tumor y administración de NaPA simultáneas. Siete de 10 ratas tratadas con NaPA sobrevivieron durante >90 días después de la inoculación de tumor cuando se administró NaPA durante 4 semanas comenzando el día de la inoculación de tumor. Nueve de 10 ratas control murieron en el intervalo de 34 días después de la inoculación de tumor ($p < 0,01$, ensayo de Mantel-Haenzel).

Tratamiento de tumores establecidos con NaPA. Cinco de las 12 ratas tratadas con NaPA s. c. e i. p. durante 4 semanas (comenzando 7 días después de la inoculación de tumor) todavía están vivas 50 días después de la inoculación del tumor, mientras que 12 de 13 ratas tratadas con solución salina murieron el día 36 ($p < 0,03$, ensayo de Mantel-Haenzel).

Toxicidad. No se detectaron efectos adversos del tratamiento con NaPA en ninguna rata tratada. La evaluación histológica de los principales órganos periféricos y del cerebro no tumoral no indicó anormalidades.

Discusión. El fenilacetato indujo un potente efecto citostático y antitumoral en los modelos de tumor cerebral *in vitro* e *in vivo* usados en estos estudios. Este efecto se extendió más allá de la duración de la administración del fármaco, indicado por la supervivencia a largo plazo y la cura aparente de las ratas que recibieron NaPA de forma simultánea con la inoculación de tumor o después de que se hubieran establecido los tumores. Este efecto prolongado del NaPA muestra que el fenotipo maligno de células tumorales tratadas se invirtió, quizás irreversiblemente en algunos animales, hasta uno que era más benigno y diferenciado. La independencia de anclaje, es decir, la capacidad de las células de formar colonias en agar semi-sólido, es característica de células de glioma maligno. El fenilacetato causó una restauración dependiente de dosis de la dependencia de anclaje, indicando la inversión de las células de glioma hasta un fenotipo no maligno. Más del 80% de la inhibición de la formación de colonias se logró a una concentración de NaPA en la placa de agar de 2,5 mM, similar a los niveles en suero y LCR medidos en las ratas tratadas. Además, después de una semana de exposición a NaPA, más del 40% de las células tumorales mantuvieron un patrón de crecimiento benigno a pesar de la ausencia de NaPA en las placas de agar (Tabla 3). Un indicador *in vivo* significativo de diferenciación celular se observó en el estudio en las organelas subcelulares de las células de tumor cerebral tratadas. El NaPA transformó los polirribosomas citoplásmicos desorganizados de las células tumorales tratadas con solución salina en un retículo endoplásmico rugoso, bien organizado. El retículo endoplásmico es una estructura altamente especializada que realiza muchas funciones diferentes. Por tanto, un retículo endoplásmico bien desarrollado representa diferenciación celular y actividad funcional. Se ha observado una relación inversa entre la cantidad de retículo endoplásmico rugoso y la tasa de crecimiento y el grado de malignidad de tumores [Ghadially FN. Diagnostic Electron Microscopy of Tumors. eds. 2. London: Butterworth; 1985]. Los numerosos polirribosomas de las células tumorales no tratadas tuvieron una buena correlación con el número de mitosis observadas por microscopía óptica y se confirmaron por el ensayo de proliferación con BrdU. Estos cambios ponen de relieve el efecto diferenciador del NaPA sobre las células gliales malignas y se correlacionan con la disminución *in vivo* de la proliferación de células y la supervivencia prolongada que tuvo lugar en animales con tumores cerebrales tratados.

En las ratas tratadas se alcanzaron niveles terapéuticos de NaPA en sangre y LCR. Los altos niveles en LCR indican una buena penetración del NaPA en el sistema nervioso central y en el tumor en desarrollo. Las dosis usadas están bien por debajo de los niveles tóxicos conocidos de NaPA en niños con errores congénitos de la síntesis de urea (2,5 g/kg/d) o ratas (1,6 g/kg/d) e indican que el NaPA se puede suministrar de forma segura a dosis mayores, posiblemente con una potenciación de la eficacia antitumoral. Estos datos indican que el fenilacetato, administrado a ratas a una dosis no tóxica, tiene un efecto profundo en la regulación del crecimiento tumoral y la maduración celular.

Ejemplo 3

Supresión de carcinogénesis inducida por 5-Aza-2'-desoxicitidina

Los inductores de la diferenciación seleccionados por su bajo potencial citotóxico y genotóxico podrían tener un valor principal en la terapia de quimioprevención y de mantenimiento. Específicamente, la capacidad del fenilacetato de prevenir la carcinogénesis mediante el fármaco quimioterapéutico hipometilante, 5-aza-2'-desoxicitidina (5AzadC), se ensayó *in vitro* y en ratones. La exposición transitoria a 5AzadC de fibroblastos 4C8 inmortalizados transformados por ras, pero no tumorigénicos, dio como resultado una transformación neoplásica manifestada por pérdida de inhibición por contacto del crecimiento, invasividad adquirida y tumorigenicidad en ratones atímicos. Lo último se asoció a un aumento de la expresión ras y una disminución de la biosíntesis de colágeno. Estos profundos cambios fenotípicos y moleculares se evitaron por un tratamiento simultáneo con fenilacetato. La protección contra carcinogénesis por 5 AzadC por el fenilacetato fue: (a) altamente eficaz a pesar de la hipometilación del ADN por ambos fármacos; (b) libre de efectos citotóxicos y genotóxicos; (c) estable después de que se interrumpiera el tratamiento y (d) reproducible *in vivo*. Mientras que los ratones atímicos que llevaban células 4C8 desarrollaron fibrosarcomas después de una única inyección i. p. con 5 AzadC, el desarrollo del tumor se inhibió significativamente mediante el tratamiento sistémico con dosis no tóxicas de fenilacetato. El fenilacetato y su precursor adecuado para administración oral, fenilbutirato, puede representar por tanto una nueva clase de agentes quimiopreventivos, cuya eficacia y seguridad se debe evaluar adicionalmente.

La naturaleza multi-etapa de la transformación neoplásica hace que este proceso patológico se pueda corregir por intervención quimiopreventiva. Se ha demostrado que varios agentes inhiben la carcinogénesis y de este modo previenen el desarrollo de cánceres primarios o secundarios [Kelloff, G. J., C. W. Boone, W. F. Malone y V. E. Steele. 1992. Chemoprevention clinical trials. *Mutation Res.* 267: 291-295; Weinstein, B. I. 1991. Cancer prevention: Recent progress and future opportunities. *Cancer Res.*, 51:5080s-5085s; Wattenberg, L. W. Inhibition of carcinogenesis by naturally occurring and synthetic compounds. In: Y. Kuroda, D. M. Shankel y M. D. Waters (eds), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II*, págs. 155-166. Nueva York: Plenum Publishing Corp., 1990; Sporn, M. B. y D. L. Newton. 1979. Chemoprevention of cancer and retinoids. *Fed. Proc.* 38:2528-2534]. De interés principal son productos naturales y sus análogos, incluyendo vitaminas (A, B12, C, D3 y E), retinoides y terpenos. Estos agentes pueden suprimir la transformación neoplásica posterior a una agresión carcinogénica regulando el crecimiento y la diferenciación celular. El fenilacetato es uno de tales reguladores del crecimiento.

La eficacia del fenilacetato como un agente quimiopreventivo se ensayó usando modelos *in vitro* e *in vivo* de carcinogénesis inducida por 5AzadC. A pesar de la promesa del 5AzadC en el tratamiento del cáncer y hemoglobinopatías de cadena beta, sus aplicaciones clínicas se han dificultado por motivos relacionados con el potencial carcinogénico. El modelo usado en los presentes estudios implicó fibroblastos murinos premalignos (líneas celulares 4C8 y PR4), que expresan un protooncogen *c-Ha-ras* activado por transcripción. Estas células no tumorigénicas son altamente susceptibles a conversión maligna por dosis farmacológicas de 5AzadC. Sin embargo, el fenilacetato puede proteger tales células vulnerables de carcinogénesis inducida por 5AzadC tanto en cultivo como en ratones.

Cultivos celulares y reactivos. Los subclones de fibroblastos NIH 3T3 de ratón, PR4N y 4C8-A10 (denominados en este documento PR4 y 4C8) se han descrito previamente [Wilson, V. L., R. A. Smith, H. Autrup, H. Krokan, D. E. Musci, N-N-T, Le, J. Longoria, D. Ziska y C. C. Harris. 1986. Genomic 5-methylcytosine determination by 32P-postlabeling analysis. *Anal. Biochem.* 152:275-284; Dugaiczky, A, J. J. Haron, E. M. Ston, O. E. Dennison, K. N. Rothblum y R. J. Schwartz. 1983. Cloning and sequencing of a deoxyribonucleic acid copy of glyceraldehydes-3-phosphate dihydrogenase messenger ribonucleic acid isolated from chicken muscle, *Biochem.* 22:1605-1613]. Ambas líneas celulares son inversiones fenotípicas aislados de células 3T3 transformadas LTR/*c-Ha-ras*1 después del tratamiento a largo plazo con interferón α/β murino. Los cultivos se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Gibco) y antibióticos. Las sales sódicas de los ácidos fenilacético y fenilbutírico (Elan Pharmaceutical Corporation) se disolvieron en agua destilada: se disolvió 5AzadC (Sigma St. Louis MO) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta su uso. En todo momento se evitó la exposición de 5AzadC a luz directa para evitar la hidrólisis del fármaco.

Tratamiento con 5AzadC. Para el tratamiento en cultivo, las células se sembraron a $1-2 \times 10^5$ células en placas de 100 mm y se añadieron los fármacos al medio de crecimiento 20 y 48 horas más tarde. Posteriormente las células se subcultivaron en ausencia de los análogos de nucleósido y se observaron para alteraciones fenotípicas. Para el tratamiento *in vivo* con 5AzadC se inocularon a ratones desnudos atímicos hembra de 6-9 semanas de edad (Division of Cancer Treatment, NCI Animal Program, Frederick Cancer Research Facility) por vía subcutánea (s. c.) $0,5 \times 10^6$ células. Después de veinticuatro horas se administraron a cada animal (aproximadamente 20 mg/kg) por vía intraperitoneal (i. p.) 400 μ g de 5AzadC recién preparada en 200 μ l de PBS. El tratamiento sistémico con NaPA se describe en el texto.

Crecimiento en Matrigel. La capacidad de las células de degradarse y cruzar barreras tisulares se evaluó mediante un ensayo de invasión *in vitro* cualitativo que utiliza matrigel, una membrana basal reconstituida (Collaborative Research). Las células se expusieron durante 48 horas en placas de plástico de T. C. con 5AzadC sola o en combinación con NaPA. El tratamiento con NaPA continuó durante 1-2 semanas adicionales. Las células después se resembraron (a 5×10^4 por punto) sobre placas de 16 mm (Costar, Cambridge, MA) que se revisitaron previamente con 250 μ l de matrigel (10 mg/ml). Se añadió NaPA a las placas o se omitió para determinar la capacidad de inversión del efecto. En el intervalo de 12 horas se produjo la formación de tipo red característica de células invasivas; la invasión en el matrigel fue evidente después de 6-9 días.

Formación de Tumores en Ratones Atímicos. Se inyectaron células s. c. (5×10^5 células por sitio) en ratones desnudos atímicos hembra de 4-6 semanas de edad (Division of Cancer Treatment, NCI Animal Program, Frederick Cancer Research Facility). El número, tamaño y peso de los tumores se registraron después de 3-4 semanas. Para el examen histológico se extirparon los tumores, se fijaron en solución de Bouin (ácido pícrico: formaldehído al 37%: ácido acético glacial, 15:5:1 vol/vol) y se tiñeron con H & E.

Medición de Metilación de ADN. Para determinar el contenido de 5-metilcitosina se tomaron muestras de cultivos 24 horas después del segundo tratamiento con 5 AzadC. Los sedimentos celulares se lisaron en SDS al 0,5%, NaCl 0,1 M, EDTA 10 mM pH 8,0, se añadieron 400 pg/ml de proteinasa K (Boehringer Mannheim) y se almacenaron a -70°C hasta el aislamiento y análisis del ADN. El contenido de residuos de citosina metilada/no metilada en el ADN celular se midió mediante una técnica de postmarcación con 32 P como se ha descrito previamente.

Análisis de Transferencia de Northern y Sondas de ADN. Se extrajo ARN ctoplásmico de células en crecimiento exponencial y se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1, 2%-formaldehído. Se realizaron la preparación del ARN, la transferencia sobre membranas de nylon (Schleicher and Schuell), la hibridación con sondas de ADN radiomarcadas y la autoradiografía como se describe [Rimoldi, D., V. Srikantan, V. L. Wilson, R. H. Bassin y D. Samid. 1991. Increased sensitivity of nontumorigenic fibroblasts expressing ras or myc oncogenes to malignant transformation

induced by 5-aza-2'-deoxycytidine. Cancer. Res. 51:324-330]. Las sondas de ADN incluían: un fragmento EcoRI de 6,2 kb de v-Ki-ras, un fragmento SacI de 2,9 kb del gen humano c-Ha-ras1 y un fragmento BamHI de 4,5 kb del gen c-myc. M. A. Taha ski (Universidad de Texas, Houston) proporcionó ADNc de gliceraldehido fosfato deshidrogenasa [Dugaiczky, A., J. J. Haron, E. M. Ston, O. E. Dennison, K. N. Rothblum y R. J. Schwartz. 1983. Cloning and sequencing of a deoxyribonucleic acid copy of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase messenger ribonucleic acid isolated from chicken muscle. Biochem. 22:1605-1613] y G. T. Bowden (Universidad de Arizona, Tucson), ADNc de transina de ratón. La sonda de ADNc para antígenos de histocompatibilidad de clase I de ratón fue un obsequio de G. Jay (NIH, Bethesda). Se prepararon sondas radiomarcadas con [³²P]dCTP (NEN) usando un kit de marcación de ADN con cebadores al azar (Boehringer Mannheim, Alemania).

Carcinogénesis In Vitro Inducida por 5AzadC y su Prevención por Fenilacetato. 4C8 y PR4 no tratadas formaron monocapas inhibidas por contacto compuestas por células de tipo epitelial. Conforme a observaciones previas, la exposición transitoria de estos cultivos a 5AzadC 0,1 μ M durante la fase logarítmica del crecimiento dio como resultado una transformación neoplásica rápida y masiva. En el intervalo de una semana de tratamiento con 5AzadC, la gran mayoría de la población celular se convirtió en refringente y de conformación larga y delgada y formó cultivos multicapa con densidades de saturación aumentadas (Tabla 4), indicativos de pérdida de inhibición por contacto del crecimiento. Estos cambios fenotípicos se podrían evitar mediante la adición de NaPA 5-10 mM (Tabla 4). Se observó que varios programas diferentes de tratamiento con NaPA son eficaces de manera similar. Estos incluían: (a) pretratamiento con NaPA, comenzando un día antes de la adición de 5AzadC; (b) exposición simultánea a ambos fármacos; y (c) adición de NaPA un día después de 5AzadC. En todos los casos, las células se sometieron posteriormente a tratamiento continuo con NaPA durante al menos una semana. Las células cultivadas en estas condiciones, como las tratadas sólo con NaPA, formaron monocapas inhibidas por contacto que se asemejaban a controles no tratados. Estas células conservaron el patrón de crecimiento benigno durante al menos tres semanas después que se interrumpiera el tratamiento con NaPA.

El que el NaPA evita la transformación neoplásica se indicó adicionalmente por la incapacidad de las células de invadir las membranas basales reconstituidas (matrigel) y formar tumores en ratones atímicos. Cuando se sembraron en matrigel, las células 4C8 y PR4 transformadas con 5AzadC desarrollaron estructuras de tipo red características de células altamente malignas, y finalmente degradaron los componentes de la matriz extracelular. En un marcado contraste, los cultivos tratados con NaPA formaron pequeñas colonias no invasivas sobre la parte superior del matrigel, como se observó previamente con fibroblastos normales. Las células parentales no tratadas mostraron un fenotipo intermedio, ya que sus colonias tenían un crecimiento lento y no eran invasivas, aunque con forma irregular posiblemente debido a motilidad celular aumentada. El efecto quimiopreventivo del fenilacetato se podría imitar por su precursor, fenilbutirato. Las células expuestas al 5 AzadC en presencia de fenilbutirato sódico (NaPB, 1,5-3 mM) conservaron crecimiento inhibido por contacto y mostraron un fenotipo benigno cuando se colocaron sobre matrigel (Tabla 4).

TABLA 4

Efecto de 5 AzadC y NaPA sobre la Metilación del ADN

Células	Tratamiento ^a	Metilación del ADN	
		% de 5mC ^b	% de Control
4C8	ninguno	3,49 $\pm$ 0,06	100
	5 AzadC	1,52 $\pm$ 0,27	43
	NaPA	2,22 $\pm$ 0,10	63
	5 AzadC +	1,62 $\pm$ 0,18	46
	NaPA		
PR4	ninguno	2,72 $\pm$ 0,16	100
	5 AzadC	1,11 $\pm$ 0,22	41
	NaPA	1,25 $\pm$ 0,08	46
	5 AzadC +	1,06 $\pm$ 0,11	39
	NaPA		
^a Las células se trataron con 5 AzadC 0,1 μ M y/o NaPA 10 mM y el porcentaje de 5 mC se determinó como se describe en "Materiales y Procedimientos".			
^b Los datos indican la media + D. T. (n=4) de dos experimentos.			

Las características de crecimiento *in vitro* de las células se correlacionaron con su comportamiento en ratones atímicos. Las células 4C8 tratadas con 5 AzadC desarrollaron fibrosarcomas de rápido crecimiento a las 2 semanas del trasplante s. c. en ratones. Concordando con su comportamiento *in vitro*, las células parenterales fueron mucho menos agresivas, formando pequeñas lesiones después de 3-4 semanas en tres de ocho animales receptores. Sin embargo, no se desarrollaron tumores en los animales a los que se había inyectado células 4C8 que habían sido pre- tratadas durante una semana en cultivo con la combinación de 5 AzadC y NaPA (Tabla 4). Tampoco hubo formación de tumor en ratones a los que se había inyectado células 4C8 tratadas solamente con NaPA. Por lo tanto, se deduce que el NaPA indujo la inversión fenotípica de los fibroblastos premalignos y evitó su conversión maligna mediante el análogo de citosina.

Modulación de la Expresión Génica por NaPA. Las líneas celulares 4C8 y PR4, procedentes de NIH 3T3, llevan un protooncogen c-Ha-ras activado por LTR. El análisis de transferencia de Northern de 4C8 tratadas con 5 AzadC mostró un aumento significativo de los niveles de ARNm y una disminución del marcador de diferenciación, los transcritos de colágeno a (tipo I). No se produjeron cambios de este tipo en la expresión génica de cultivos a los que se había añadido NaPA. La retirada de NaPA después de una semana de tratamiento continuo no provocó la restauración de la expresión *ras*, confirmando que el beneficio terapéutico del NaPA es estable en ausencia de tratamiento adicional.

Efecto de fenilacetato y 5 AzadC en la metilación del ADN. La 5 AzadC es un potente inhibidor de la metilación del ADN, un mecanismo epigenético implicado en el control de la expresión génica y el fenotipo celular. La hipometilación puede subyacer al efecto terapéutico de 5AzadC en cáncer y en anemias congénitas graves [Mompalmer, R. L., G. E. Rivard y M. Gyger. 1985. Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia. *Pharmac. Ther.* 30:277-286; Stamatoyannopoulos, J. A. y A. W. Nienhuis. 1992. Therapeutic approaches to hemoglobin switching in treatment of hemoglobinopathies. *Annu. Rev. Med.*; 43:497-521; Ley, T. J., J. DeSimone, N. P. Anagnou, G. H. Keller, R. K. Humphries, P. H. Turner, P. H., N. S. Young, P. Heller y A. W. Nienhuis. 1982. 5-Azacytidine selectively increases gamma-globin synthesis in a patient with beta+ thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 307:1469-1475]. Sin embargo, los cambios en la metilación del ADN también podrían ser responsables de su potencial carcinogénico. Por lo tanto, interesaba determinar el grado de metilación del ADN en células protegidas por fenilacetato. Como se esperaba, la 5AzadC causó una disminución significativa del contenido de 5-metilcitosina (5 mC) (Tabla 5). Hubo, sin embargo, una disminución comparable de 5 mC en células tratadas con 5AzadC en combinación con NaPA, así como en las tratadas solamente con NaPA (Tabla 5).

TABLA 5

Prevención in vitro por fenilacetato de carcinogénesis inducida por 5 AzadC

Tratamiento Celular	Densidad de Saturación ^a (células/cm ² x 10 ⁻⁵)	Invasividad ^b	Tumorigenicidad en Ratones ^c	
			Incidencia	Tamaño del Tumor (mm)
Ninguno	3,9	-	3/8	1,0 (0,5-2)
5 AzadC	7,0	+	8/8	11,45 (4-19)
5 AzadC + NaPA	1,6	-	0/8	0

	Tratamiento Celular	Densidad de Saturación ^a (células/cm ² x 10 ⁻⁵)	Invasividad ^b	Tumorigenicidad en Ratones ^c	
				Incidencia	Tamaño del Tumor (mm)
5					
10					
	5 AzadC + NaPB	1,1	-	ND	
15	NaPA	ND	-	0/8	0
	NaPB	1,3	-	ND	
20	^a Las células se trataron simultáneamente con los fármacos indicados y se mantuvieron en cultivo durante 5 días post confluencia, momento en el que se separaron y recontaron. La exposición a 5AzadC fue transitoria como se describe en Materiales y Procedimientos, mientras que el tratamiento con NaPA y NaPB continuó a lo largo del experimento. Se obtuvieron resultados similares cuando se inició el tratamiento con NaPA un día antes o después de la exposición de las células a 5 AzadC (datos no mostrados).				
25	^b Las células se sembraron sobre una capa de matrigel y se observaron para un patrón de crecimiento maligno, es decir, el desarrollo de procesos característicos y degradación de la membrana basal reconstituida y la invasión hacia la superficie de plástico subyacente.				
30	^c Las células pretratadas en cultivo se inyectaron s. c. (5 x 10 ⁵ células por sitio) en ratones desnudos atímicos hembra de 2 meses de edad. Los resultados determinados después de 3 semanas indican la incidencia (animales inyectados, portadores de tumor) y el tamaño del tumor. Los valores del tamaño del tumor son un medias (intervalo). ND = no determinado.				
35					
40					
45					
50					
55					

60 *Quimioprevención In Vivo por NaPA.* Para determinar la eficacia del NaPA *in vivo*, los estudios se extendieron para incluir un modelo de animal que implicaba ratas atímicas portadoras de las células 4C8 no tumorigénicas transplantadas por vía subcutánea. Una única inyección i. p. en ratones con 5 AzadC (20 mg/kg) dio como resultado desarrollo de tumor en el sitio de la inoculación de células 4C8. Sin embargo, cuando los ratones se pretrataron con NaPA 1,5 h antes de la inyección de 5AzadC, y el tratamiento con NaPA continuó durante 22 días después de esto, disminuyó significativamente la incidencia de la formación de tumor (Tabla 6). No hubo efectos adversos asociados al tratamiento con NaPA como se indica por el peso y el comportamiento de los animales. Además, a pesar de causar hipometilación del ADN, el NaPA no induce la transformación neoplásica de células 4C8 transplantadas. Los animales protegidos por NaPA no desarrollaron tumores o formaron lesiones de crecimiento lento en el sitio de la inoculación de 4C8. Los

datos de los animales son compatibles con los hallazgos *in vitro*, indicando que el NaPA puede evitar la transformación neoplásica inducida por 5 AzadC sin producir toxicidades significativas.

TABLA 6

Quimioprevención In Vivo por Fenilacetato

Grupo	Tratamiento de Animales ^a	Incidencia de Tumor ^b positivo/total	Tamaño de Tumor ^c media (intervalo)
A	PBS	0/4	0
B	NaPA	0/4	0
C	5AzadC+PBS	9/9	12 (2-29)
D	5AzadC+ NaPA	4/10	3 (0-10)

^a Se transplantaron s. c. células 4C8 (5×10^5 por sitio) en ratones atímicos. Al día siguiente, los animales se trataron i. p. con 400 mg/kg de NaPA, y 1,5 h más tarde con 20 mg/kg de 5 AzadC. El tratamiento con NaPA se repitió 4,5 h después de la inyección de 5 AzadC. Los tratamientos posteriores implicaron inyecciones de NaPA dos veces al día durante 8 días y una vez al día durante 2 semanas adicionales. Se usó PBS como control.

^b Los datos indican el crecimiento de tumor 4 semanas después del tratamiento con 5AzadC. Después se desarrollaron de forma espontánea tumores en animales de control que recibían PBS, y posteriormente en los tratados con NaPA.

^c Diámetro del tumor en milímetros.

Hay un interés considerable en el uso de inductores de diferenciación no tóxicos en la quimioprevención del cáncer. La toxicidad del fármaco es particularmente importante considerando el estado general de salud y el tiempo de vida variable de las poblaciones candidatas, es decir, individuos de alto riesgo y pacientes en remisión. El inductor de diferenciación fenilacetato puede prevenir la carcinogénesis inducida por 5 AzadC tanto *in vitro* como *in vivo* cuando se usa a dosis no tóxicas.

La quimioprevención se puede lograr bloqueando la etapa de “inicio” de la carcinogénesis (es decir, mutagénesis) o suprimiendo la “promoción” y la progresión a malignidad. Los actuales estudios, que usan células premalignas con un oncogen ras activado como un modelo, examinaron la eficacia del fenilacetato como un fármaco anti-promocional. Otros agentes quimiopreventivos bien caracterizados que bloquean la promoción incluyen vitamina A y sus retinoides sintéticos; como el fenilacetato, estos compuestos también son reguladores del crecimiento y de la diferenciación celular.

Los estudios actuales han aprovechado modelos *in vitro* e *in vivo* que implican fibroblastos (denominados 4C8 y PR4) que son altamente vulnerables a conversión maligna por los agentes hipometilantes de ADN 5 AzadC y 5 AzaC (16,17). La exposición transitoria de estas células a 5 AzadC, ya sea en cultivo o en ratones atímicos receptores, causó la rápida transformación neoplásica. La conversión maligna se asoció a un aumento de los niveles de ARNm de ras y una regulación negativa de la expresión de colágeno de tipo I, indicando pérdida de diferenciación celular. Estos pro-

fundos cambios biológicos y moleculares introducidos por 5 AzadC se evitan mediante un tratamiento simultáneo con concentraciones no citotóxicas de fenilacetato y su precursor, fenilbutirato. La actividad antitumoral del fenilacetato y la falta de toxicidad se confirmaron en ratones atímicos. En el modelo *in vivo*, se inyectó i. p. 5 AzadC a ratones portadores de las células 4C8 susceptibles transplantadas s. c. Todos los ratones tratados de esta forma desarrollaron fibrosarcomas de rápido crecimiento; sin embargo, la incidencia de la formación de tumor se redujo notablemente mediante tratamiento sistémico con NaPA.

El mecanismo por el que el NaPA evitó la conversión maligna inducida por 5 AzadC no está claro. Al igual que otros agentes quimiopreventivos que bloquean la promoción, el fenilacetato puede actuar induciendo citostasis y maduración del tumor. Cada vez hay más evidencias que indican que el fenilacetato puede provocar la interrupción selectiva del crecimiento y la diferenciación tumoral *in vitro* y en modelos de roedores. En algunos casos, por ejemplo, leucemia promielocítica, la diferenciación inducida por fenilacetato se ha vinculado a una disminución de la expresión del oncogen *myc*. En 4C8 tratadas con NaPA, la protección contra desdiferenciación (evidenciada por características de crecimiento y expresión de colágeno), se asoció a inhibición de la sobreexpresión de *ras*. La regulación negativa de la expresión de oncogenes puede, por tanto, ser en parte responsable de la actividad quimiopreventiva del NaPA. Además de afectar a *ras* a niveles de ARNm, el fenilacetato, un inhibidor de la vía de mevalonato de la síntesis de colesterol [Castillo, M., J. Iglesias, M. F. Zafra y E. García-Peregrin. 1991. Inhibition of chick brain cholesterolgenic enzymes by phenyl and phenolic derivatives of phenylalanine. *Neurochem. Int.* 18: 171-174], también podría bloquear la modificación post-traduccional de la proteína codificada por *ras*, p21. El limoneno, un inhibidor de la prenilación de p21, también es un agente quimiopreventivo.

El fenilacetato bloqueó la carcinogénesis por 5 AzadC a pesar de la disminución del contenido de 5 mC. De hecho, se ha observado que el propio NaPA inhibe la metilación del ADN; pero, en contraste con la 5 AzadC, el NaPA no fue carcinogénico. Las correlaciones entre el potencial carcinogénico y las actividades de hipometilación del ADN de los agentes químicos se han documentado previamente en modelos de cultivo tisular, y se propuso alteraciones de los patrones de 5 mC de ADN contribuyen y potencian el inicio de la carcinogénesis. Sin embargo, los presentes datos indican que los cambios cuantitativos solamente en la metilación del ADN no son suficientes para afectar al fenotipo celular y por tanto, la actividad hipometilante no es suficiente para inducir el fenotipo tumorigénico en estos modelos *in vitro* y animales.

Varios laboratorios han informado acerca de la inducción selectiva de genes específicos por factores intracelulares y agentes químicos posteriormente a desmetilación. Por ejemplo, se ha observado que un aumento de la expresión *in vitro* de genes de gamma-globina humana requiere la activación por hexametilenbisacetamida después del tratamiento con 5 AzaC [Ley J. T., Y. L. Chiang, D. Haidaris, N. P. Anagnou V. L. Wilson y W. F. Anderson. 1984. DNA methylation and regulation of the human β -globin like genes in mouse erythroleukemia cells containing human chromosome 11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 6618-6622]; la desmetilación del gen mediante 5 AzaC no fue suficiente para la expresión génica. Por el contrario, el fenilacetato y fenilbutirato indujeron la expresión del gen de la gamma-globina con posterior acumulación de hemoglobina fetal en progenitores de eritrocitos cultivados y en seres humanos. Además de afectar a la metilación del ADN, el NaPA y el NaPB también activan un receptor nuclear que funciona como un factor transcripcional (el receptor de proliferador de peroxisoma se discute en este documento). Por tanto, una posible explicación de las diferencias en las actividades carcinogénicas opuestas entre NaPA/NaPB y 5 AzadC observadas en este documento puede ser la capacidad de los ácidos grasos aromáticos de inducir la expresión de genes críticos para el control del crecimiento. El fenilacetato y los compuestos relacionados posiblemente pueden invertir el estado mediado por metilación de represión de anti-oncogenes silenciosos. El hallazgo de hipometilación de ADN por NaPA en células de mamífero no constituye una sorpresa en vista de los estudios previos que demuestran que, a concentraciones milimolares, el fenilacetato inhibe la metilación del ADN en plantas. De forma interesante, a tales concentraciones elevadas, el fenilacetato también inhibe la proliferación de células tumorales en plantas. Por lo tanto, el efecto del fenilacetato en la metilación del ADN y su papel en la regulación del crecimiento y la diferenciación se han conservado en la evolución.

El resultado de combinar NaPA con 5 AzadC (o 5 AzaC) es de interés particular. Se ha demostrado que los análogos de citosina benefician a pacientes con graves trastornos de la sangre tales como leucemia, anemia falciforme y β -talasemia. Ahora hay datos experimentales que sugieren que la 5 AzadC también puede ser activa en algunos tumores sólidos, incluyendo melanoma maligno (Weber y col., presentado) y carcinoma de próstata. Desafortunadamente, la aplicación clínica de 5 AzadC ha estado limitada por cuestiones relacionadas con la carcinogénesis. Los datos indican que el NaPA puede minimizar el riesgo carcinogénico, mientras que conserva y potencia los efectos terapéuticos de la 5 AzadC. Los estudios con células de leucemia humana y con progenitores de eritrocitos obtenidos de pacientes con β -hemoglobinopatías mostraron que el NaPA puede potenciar la eficacia de 5 AzadC, provocando la superinducción de la producción de hemoglobina fetal. Además, la adición de NaPA/NaPB a concentraciones no tóxicas, pero subóptimas de 5 AzadC, indujo la interrupción completa del crecimiento y promovió la apoptosis en células cultivadas de carcinoma prostático resistente a hormonas (datos no publicados).

Parece, por lo tanto, que el fenilacetato, un derivado de aminoácido común, puede ser valioso como agente antitumoral y quimiopreventivo. El NaPA, que tiene un olor desagradable, se puede sustituir por su precursor, NaPB (o un derivado o análogo de NaPB), para la administración por vía oral. Después de la ingestión por seres humanos, el fenilbutirato experimenta β -oxidación hasta fenilacetato. Al igual que el NaPA, el NaPB muestra actividades antitumorales y quimiopreventivas en modelos experimentales, y ya se ha demostrado que ambos fármacos son seguros para el tratamiento oral a largo plazo de niños con trastornos del ciclo de la urea. Estudios clínicos más recientes que

implican adultos con cáncer han confirmado que se pueden lograr niveles plasmáticos milimolares de fenilacetato y fenilbutirato sin efectos adversos significativos. El NaPB/NaPA beneficiará a individuos de alto riesgo predispuestos a desarrollo de cáncer aplicado en combinación con otras sustancias terapéuticas anticancerígenas para potenciar la eficacia y minimizar los efectos adversos, y posiblemente se pueda usar en terapia de mantenimiento para prevenir una recaída de la enfermedad.

Sección F

Medios para controlar el nivel de dosificación de ácido fenilacético o sus derivados en un paciente y/o la respuesta del paciente a estos fármacos

Como se ha discutido anteriormente, la administración de ácido fenilacético o un derivado de ácido fenilacético tal como NaPA o NaPB a un animal (ser humano) en las cantidades y durante los transcurso de tratamiento como se describe en este documento, induce una diversidad de cambios moleculares. Estos rasgos moleculares se pueden usar como biomarcadores para (1) controlar el nivel de dosificación del fármaco o su biodisponibilidad en el animal y/o (2) servir como un biomarcador de la respuesta del paciente al fármaco. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, la administración de una cantidad eficaz de NaPA o NaPB (o sus derivados) da como resultado una diversidad de efectos moleculares, incluyendo a) niveles aumentados de hemoglobina fetal en eritrocitos; b) producción aumentada de TGF- α en diversas células tales como las de origen melanocítico, de linaje astrocítico o de tipos de células epiteliales; c) inhibición de la producción de IL-6; y d) inhibición de la producción de TGF- β 2. Por tanto, se pueden determinar concentraciones absolutas o relativas (antes/después del tratamiento) de un biomarcador particular en una población celular apropiada del individuo para permitir el control del nivel de dosificación o la biodisponibilidad del fármaco. Además, esta concentración se puede correlacionar o comparar con respuestas del paciente para desarrollar una escala de respuesta del paciente para un objetivo de tratamiento deseado basada en ese biomarcador. Por ejemplo, la cantidad aumentada de hemoglobina fetal se puede usar para indicar la biodisponibilidad de PA o PB para el tratamiento o la prevención de una afección neoplásica así como para indicar el grado de respuesta del paciente al fármaco.

Sección G

La activación del PPAR por ácido fenilacético y sus derivados

Los peroxisomas son organelas celulares que contienen enzimas que controlan el potencial redox de la célula metabolizando una diversidad de sustratos tal como peróxido de hidrógeno. Recientes avances en esta área muestran que se pueden proliferar los peroxisomas mediante la activación de un receptor nuclear que regula la transcripción de genes específicos (Gibson, Taxicol. Lett., 68(1-2): 193(1993)). Este receptor nuclear se ha denominado el receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR) y pertenece a la familia de receptores nucleares esteroides que tienen un efecto importante en la expresión génica y la biología celular. La unión por proliferadores de peroxisomas tales como clofibrato, herbicidas y antagonistas de leucotrieno con PPAR activa el receptor nuclear, que actúa como un factor transcripcional y puede causar diferenciación, crecimiento celular y proliferación de peroxisomas. Aunque se piensa que estos agentes juegan un papel en la hiperplasia y la carcinogénesis así como que también alteran la capacidad enzimática de células animales, tal como células de roedor, estos agentes parece que tienen efectos negativos mínimos en células humanas, como se ilustra por la seguridad de fármacos tales como clofibrato (Green, Biochem. Pharm. 43(3):393(1992)).

Los proliferadores de peroxisomas típicamente contienen un grupo funcional carboxílico. Por lo tanto se ensayaron PA, PB y diversos derivados de ácido fenilacético para su capacidad de activar el PPAR y se compararon con proliferadores de peroxisomas conocidos. Como se muestra en la Figura 5, el Clofibrato, un activador conocido de la proliferación de peroxisomas, provocó un aumento de factor 4 a 5 de la activación medido por la producción aumentada del elemento de respuesta para acil-CoA oxidasa, que es la enzima limitante de la velocidad de la beta-oxidación y está contenida en los peroxisomas (Dreyer y col., Biol. Cell, 77(1):67(1993)). El PA y el PB provocaron una leve activación (actividad el doble de la línea basal), el naftil acetato fue relativamente más activo (aumento de aproximadamente un factor de 2,5 a 4) mientras que los análogos halogenados de PB eran estimuladores muy potentes. De forma interesante, el butirato no era un activador significativo de la proliferación de peroxisomas.

Se ha demostrado que el receptor activado por proliferador de peroxisomas pertenece a la misma familia de receptores nucleares que los receptores de retinoide, tiroide y esteroide y se conoce que el PPAR interacciona con RXR, el receptor de ácido 9-cis-retinoico (un metabolito de ácido todo-trans-retinoico). Debido a que la vía de señalización de PPAR converge con la señal del receptor del retinoide 9-cis, se puede anticipar que el ácido retinoico o similares potenciarán significativamente la actividad del PA o PB u otros derivados del ácido fenilacético de esta invención. De hecho, en este documento se discute la potenciación de la inducción de la diferenciación de células HL-60 por NaPA en combinación con ácido retinoico. Adicionalmente, esta respuesta sinérgica se ha confirmado en otros tumores, como en las células de neuroblastoma, melanoma y rhabdomyosarcoma.

Por tanto, la presente invención incluye la terapia de combinación que consiste en la administración (simultáneamente/secuencialmente en la misma forma de dosificación o simultáneamente/secuencialmente en formas de dosificación separadas) de Vitamina A, Vitamina D, Vitamina C, Vitamina E, B-caroteno u otros retinoides y similares con PA, PB u otros derivados de ácido fenilacético, para cualquiera de los programas de tratamiento dados en este documento. Las dosis apropiadas de derivados de ácido fenilacético incluyen aproximadamente PA 0,5-10 mM, más preferible-

mente PA 0,5-5 mM, dosis o dosis equipotentes de un derivado de ácido fenilacético farmacéuticamente aceptable. Se supone que concentraciones entre 0,1 y 1,0 μ M de los retinoides son eficaces. Esta terapia de combinación potencia, por ejemplo, la eficacia del tratamiento con PA, PB u otros derivados de ácido fenilacético, tomados solos, para el tratamiento de cáncer, anemia y SIDA, cicatrización de heridas y tratamiento de trastornos de diferenciación no malignos.

Los agentes que afectan a peroxisomas celulares tienen un impacto importante en el estrés oxidativo y el estado redox de una célula. Por tanto, se puede encontrar evidencia adicional de que el PA, PB u otros derivados del ácido fenilacético activan el PPAR por el rápido aumento de gamma glutamil transpeptidasa y catalasa después de la exposición celular a PA o PB, como se muestra en la Figura 6. Estas enzimas antioxidantes, cuyas actividades aumentan cuando se ha activado la proliferación de peroxisomas, aumentaron un 100% 24 horas después de la administración de fenilbutirato sódico. Este efecto se invirtió aproximadamente 48 horas después y la actividad se mantuvo por debajo de los niveles de control a lo largo de 100 horas. El nivel intracelular de glutatión siguió un patrón bifásico similar con un aumento inicial (20%) seguido de una caída hasta niveles por debajo de la línea basal a las 100 h. Se observó la rápida inducción con posterior disminución brusca de estas enzimas antioxidantes en numerosos tipos de tumor de adenocarcinomas prostáticos, de mama y de colon, osteosarcoma y tumores cerebrales. El análisis molecular mostró cambios en la tasa de transcripción génica de las enzimas relacionadas con GSH y antioxidantes, que son consistentes con la activación del PPAR por PA, PB o sus análogos.

El cambio bifásico en el glutatión y las enzimas antioxidantes inducido por el tratamiento con PA, PB y otros derivados de ácido fenilacético se puede aprovechar para proporcionar protocolos de radioprotección o protocolos de radiosensibilización. El resultado depende en gran medida del programa del tratamiento. Específicamente, el tratamiento de células con PA o PB protege a las células de la radiación durante al menos aproximadamente 24 horas, mientras que una exposición más prolongada, tal como durante 72 horas, da como resultado una sensibilización significativa de células tumorales a la inactivación por terapias de radiación o quimioterapia basadas en radicales libres (por ejemplo, radiación ionizante tal como rayos x, rayos gamma, protones, electrones, isótopos o doxorubicina (adriamicina)).

Se efectuaron experimentos para examinar los efectos del tratamiento con PA o PB sobre células que se sometieron a estrés químico o de radiación. El pretratamiento de células de glioblastomas (Figura 7), carcinoma de mama y de próstata metastásicas con una dosis no tóxica de PA o PB 72 horas antes de la γ -radiación con CO^{60} o el tratamiento con adriamicina demostró un aumento significativo de inactivación celular relacionado con la dosis por cualquiera de las modalidades. La fracción superviviente de células después del tratamiento con fármaco fue aproximadamente un décimo de la fracción superviviente sin pretratamiento, lo que sugiere que el PA, PB u otros análogos similares se podrían usar para aumentar sustancialmente la eficacia de la terapia por radiación y la quimioterapia. Como tal, la presente invención incluye terapia anti-cáncer de combinación que consiste en la administración de una cantidad eficaz no tóxica de ácido fenilacético o un derivado de ácido fenilacético farmacéuticamente aceptable (de acuerdo con cualquiera de los protocolos de concentración de dosificación dados en este documento) en combinación con terapia de radiación, particularmente tratamiento local, o quimioterapia, particularmente dirigido a células tumorales. Esta terapia adyuvante se puede administrar, por ejemplo, después de aproximadamente 24 horas, tal como de 24 horas a 120 horas o más, desde el inicio de la administración del derivado.

Los ácidos grasos de fenilo tal como PA y sus derivados o análogos han mostrado un amplio intervalo de actividad en el tratamiento de glioblastomas y adenocarcinomas induciendo la diferenciación de células maligna a dosis relativamente no tóxicas. Además, se ha descubierto que el PA y sus derivados/análogos inhiben el procesamiento post-traduccional de la proteína codificada por el oncogen *ras* que se implicó en el mantenimiento de la radiorresistencia de células tumorales. Por tanto, el PA y sus derivados/análogos pueden ser radiosensibilizantes útiles y potentes. La falta de toxicidad significativa para PA/PB los convierte en radiosensibilizantes particularmente atractivos en comparación con los sensibilizantes químicos usados actualmente.

Los datos *in vitro* demuestran que la exposición celular a PA y PB dio como resultado un aumento marcado de radiosensibilidad celular en células tumorales humanas de cerebro, mama, próstata y colon. Esta radiosensibilidad aumentada se asoció a una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes protectoras tales como catalasa y gamma-glutamyl transferasa y una disminución concomitante del radioprotector de origen natural, glutatión (GSH). De forma interesante, las células de tumor de próstata altamente radiorresistentes que expresan niveles elevados del oncogen *ras* se radiosensibilizaron significativamente en comparación con células tumorales que expresan bajos niveles de *ras* que se radiosensibilizaron solamente ligeramente por la exposición a PA.

Estos resultados sugieren una consideración adicional de una diversidad de trastornos patogénicos. La respuesta inflamatoria a lesión tisular, la patogénesis del enfisema, la lesión orgánica asociada a isquemia (choque), la lesión cardíaca inducida por doxorubicina, la hepatotoxicidad inducida por fármaco, la aterosclerosis y las lesiones pulmonares hiperóxicas se asocian cada uno a la producción de especies de oxígeno reactivas y un cambio en la capacidad reductora de la célula. Aunque la exposición a largo plazo a PA u otros análogos de ácido fenilacético agota los sistemas de protección redox celulares, el tratamiento a corto plazo con PA y similares puede tener implicancias significativas para el tratamiento de trastornos asociados a especies de oxígeno reactivas aumentadas.

Sección H

Uso de ácido fenilacético y sus derivados en el tratamiento de cánceres que tienen un fenotipo multirresistente a fármacos

5 Cuando se tratan cánceres diseminados, el tratamiento sistémico con agentes citotóxicos se considera frecuentemente el tratamiento más eficaz. Sin embargo, varios cánceres muestran la capacidad de resistir los efectos citotóxicos del fármaco antineoplásico específico administrado así como otros agentes a los cuales el sistema del paciente nunca se había expuesto. Además, algunos cánceres parecen tener multirresistencia a fármacos incluso antes de la primera
 10 exposición del paciente a un fármaco antineoplásico. Se han propuesto tres mecanismos para explicar este fenómeno: Multirresistencia a Fármacos (MDR) por glicoproteína P; MDR debida a Venenos de Topoisomerasa y MDR debida a expresión alterada de enzimas metabolizantes de fármacos (Holland y col., Cancer Medicine, Lea y Febiger, Philadelphia, 1993, págs. 618-622).

15 La MDR por glicoproteína P parece estar mediada por la expresión de una bomba dependiente de energía que retira rápidamente agentes citotóxicos de la célula. Los altos niveles de glicoproteína P se asocian a la amplificación del gen de la MDR y la activación transcripcional. La expresión aumentada de la glicoproteína p también se puede estimular por choque térmico, metales pesados, otros fármacos citotóxicos y agresiones del hígado y radiación ionizante en algunas líneas celulares de algunas especies. Los resultados no son suficientemente consistentes para confirmar una
 20 relación causal pero son altamente sugerentes.

Las topoisomerasas son enzimas nucleares responsables de los cortes transitorios de la hebra de ADN durante la replicación, transcripción y recombinación del ADN. Los agentes citotóxicos, tales como etopósido, doxorubicina, amsacrina y otros, son venenos conocidos de topoisomerasa II y provocan la rotura letal de la hebra de ADN mediante
 25 la formación de complejos estables entre el ADN, la topoisomerasa II y el fármaco. Se cree que la MDR a este tipo de fármaco se provoca por cambios en la naturaleza y la cantidad de actividad enzimática, que se considera que evita la formación o el efecto del complejo ADN-enzima-fármaco.

Algunos agentes citotóxicos son capaces de inducir una capacidad metabólica aumentada que permite la rápida
 30 eliminación de la toxina. Entre las enzimas que se han implicado están las isozimas de glutatión S-transferasa (GST). Estas enzimas son responsables de la conjugación de los restos electrófilos de fármacos hidrófobos con glutatión, lo que conduce a destoxicación y eliminación del fármaco.

Como se ha discutido anteriormente, se ha demostrado que el PA y otros análogos de ácido fenilacético estimulan
 35 la proliferación de peroxisomas que contienen algunas isozimas de GST. Basándose en esa observación, se supondría que el PA y el PB también estimulan la MDR. Sin embargo, ahora se ha descubierto que sucede lo contrario. Por ejemplo, el PA inhibió el crecimiento de las células de cáncer de mama resistentes a adriamicina MCF-7 que muestran el fenotipo MDR. Con hasta PA 10 mM en cultivos, el crecimiento de células se inhibe de forma espectacular de una manera dependiente de la dosis. Sorprendentemente, el PA y el PB son más activos contra células de cáncer de
 40 mama resistentes a adriamicina que en comparación con células sensibles a adriamicina. Esta sensibilidad aumentada del fenotipo MDR se puede reproducir en otros modelos tumorales, incluyendo los que son resistentes a terapia de radiación.

Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar poblaciones de células tumorales en un
 45 paciente que son resistentes o capaces de sobrevivir a los actuales tratamientos convencionales, particularmente tumores que tienen un fenotipo de MDR, por administración al paciente cantidades no tóxicas de PA (tal como cantidades que proporcionan hasta PA 10 mM o una dosis equipotente de un derivado de ácido fenilacético farmacéuticamente aceptable) en proximidad del tumor o cantidades equivalentemente eficaces de ácido fenilacético o un análogo de ácido fenilacético. Se pueden usar los protocolos de dosificación de PA u otros análogos similares a los descritos en relación
 50 con la potenciación de la diferenciación en células tumorales por estos compuestos relacionados con el ácido fenilacético, incluyendo las diversas terapias de combinación descritas en este documento, para tratar pacientes con tumores resistentes tales como tumores MDR. Se pueden emplear beneficiosamente programas de tratamiento sustancialmente continuos a largo plazo (semanas, meses) o a corto plazo (día(s)) (incluyendo administración continua o frecuente de dosis separadas) así como programas pulsados (días, semanas o meses de administración substancialmente continua
 55 seguida de un periodo sin fármacos) para tratar pacientes con tumores MDR.

Sección I

Ácido fenilacético y sus derivados, correlación entre potencia y lipofilicidad

60 Un potencial problema que podría impedir el uso clínico del fenilacetato está relacionado con las grandes cantidades de fármaco requeridas para lograr concentraciones terapéuticas, es decir, más de 300 mg/kg/día. Los estudios en plantas han mostrado que al aumentar la lipofilicidad de un análogo de fenilacetato (medida por su coeficiente de partición octanol-agua) se potenciaba su actividad reguladora del crecimiento [Muir, R. M., Fujita, T y Hansch, C. Structure activity relationship in the auxin activity of mono-substituted phenylacetic acids. Plant Physiol., 42: 1519-1526, 1967]. Se usó el coeficiente de partición calculado (CLOGP) para correlacionar la lipofilicidad pronosticada
 65 con la actividad antitumoral medida de los análogos del fenilacetato. Para estos análogos, la potencia aumentada para

inducir citostasis e inversión fenotípica en células cultivadas de carcinoma de próstata, glioblastoma y melanoma se correlacionó con lipofilicidad aumentada del fármaco.

Cultivos celulares. Los estudios incluyeron las siguientes líneas de células tumorales humanas: (a) carcinoma prostático resistente a hormonas PC3, DU145, adquirido en la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD); (b) glioblastoma U87, A172 (ATCC); (c) melanoma A375 y mel 1011, proporcionados por J. Fidler (M. D. Anderson, Houston TX) y J. Weber (NCI, Bethesda MD), respectivamente. Las células se mantuvieron en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Gibco Laboratories), antibióticos y L-glutamina 2 mM. Se usaron para la comparación fibroblastos FS4 de prepucio humanos diploides (ATCC) y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVVC). Las células HUVVC, aisladas de cordones recién obtenidos, se proporcionaron por D. Grant y H. Kleinman (NIH, Bethesda MD).

Agentes antitumorales. El fenilacetato y fenilbutirato sódicos eran de Elan Pharmaceutical Corp, Gainesville GA. Se sintetizaron 4-yodofenilacetato, 4-yodofenilbutirato y 4-clorofenilbutirato por el procedimiento Sandmeyer a partir de los correspondientes ácidos grasos 4-amino-fenilo. Los productos halogenados se extrajeron de las mezclas de reacción ácidas con dietiléter que después se tomaron a sequedad. El residuo se disolvió en hexano en ebullición y los cristales que se formaron durante el enfriamiento se recogieron mediante filtración por succión. El producto se recrystalizó a partir del hexano hasta que se obtuvieron los puntos de fusión descritos. Se produjeron amidas de fenilacetato y fenilbutirato calentando las sales sódicas con un pequeño exceso de cloruro de tionilo seguido de la adición de amoníaco concentrado enfriado con hielo. Las amidas se purificaron por recrystalización del agua en ebullición. La identidad de los compuestos sintetizados se verificó por determinación del punto de fusión y espectroscopia de masa. Todos los derivados disponibles en el mercado se adquirieron en Aldrich (Milwaukee, WI) o Sigma (St. Louis, MO), dependiendo de la disponibilidad. Todos los compuestos ensayados se disolvieron en agua destilada, se llevaron a pH 7,0 por la adición de NaOH según fuera necesario y se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta su uso.

Cálculo de Lipofilicidades Relativas de Fármacos. La estimación de la contribución de la lipofilicidad a la actividad biológica de una molécula se basó en su logaritmo calculado del coeficiente de partición octanol-agua (CLOGP). Esto se determinó para cada compuesto usando el programa BLOGP de Bodor y col., (BLOGP versión 1.0, Center for Drug Discovery, Universidad de Florida) suponiendo que el grado de ionización es similar para todos los compuestos ensayados.

Cuantificación del Crecimiento y la Viabilidad Celular. Las tasas de crecimiento se determinaron por enumeración celular con un hemocitómetro después de la separación con tripsina-EDTA y por un ensayo enzimático usando bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Estos dos ensayos produjeron esencialmente los mismos resultados. La viabilidad celular se evaluó por exclusión con azul tripano.

Formación de Colonias en Agar Semi-Sólido. Para el análisis del crecimiento independiente de anclaje se recogieron células con tripsina-EDTA y se resuspendieron a $1,0 \times 10^4$ células por ml en medio de cultivo que contenía agar al 0,36% (Difco). Se añadieron dos ml de suspensión celular a placas de 60 mm (Costar) que se revistieron previamente con 4 ml de agar sólido (al 0,9%). Se añadieron los fármacos ensayados a diferentes concentraciones y después de 3 semanas se contaron las colonias compuestas por 30 o más células.

Crecimiento en Matrigel. Las células se trataron en primer lugar con fármacos en placas de plástico T. C. durante 4-6 días y después se resembraron (5×10^4 células por pocillo) sobre placas de 16 mm (Costar, Cambridge, MA) revestidas de 250 μ l de 10 mg/ml de matrigel, una membrana basal reconstituida (Collaborative Research). Los fármacos se añadieron a las placas o se omitieron para determinar la capacidad de invertir el efecto. En el intervalo de 12 horas se produjo la formación de tipo red característica de células invasivas, mientras que la invasión en el matrigel fue evidente después de 6-9 días.

Estudios de Captación de Fármaco. Las células se sembraron en placas T. C. de 6 pocillos (Costar) a 5×10^5 células por placa. El medio de cultivo se reemplazó después de 24 h por 750 μ l de un medio fresco que contenía 4,5 x 10⁵ DPM de ácido ¹⁴C-fenilacético (3,4 mCi/mmol, Sigma) o ácido ¹⁴C-naftilacético (5,4 mCi/mmol, Sigma), y los cultivos se incubaron durante 10-180 minutos a 37°C. La marcación finalizó colocando las placas sobre hielo. Las células se lavaron después dos veces con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo (PBS), se separaron por raspado y se determinó la radioactividad conservada por las células usando escintilación líquida. Los valores en blanco se determinaron incubando los compuestos radiomarcados en una placa vacía.

Correlación entre Lipofilicidad del Fármaco y el Efecto Inhibidor del Crecimiento de Fenilacetato y sus Análogos. El efecto inhibidor del crecimiento de estos compuestos sobre líneas celulares de carcinoma prostático, glioblastoma y melanoma se expresa como CIS₅₀ y se correlaciona con lipofilicidad de fármaco determinada utilizando el programa CLOGP. Como se observa en las Tablas 14 y 15 existe una buena correlación entre la citostasis y la lipofilicidad. De acuerdo con observaciones previas con fenilacetato, el efecto citostático fue selectivo cuando se necesitaron mayores concentraciones de fármaco para afectar significativamente a la proliferación de células endoteliales normales y fibroblastos de piel. No sucedió citotoxicidad (es decir, disminución de viabilidad celular) durante 4-6 días de tratamiento continuo con los compuestos ensayados.

ES 2 303 624 T3

TABLA 14

Fenilacetato y análogos que contienen sustituciones en la cadena alquilo: Relación de CI₅₀ a CLOGP

CI ₅₀ (mM)					
Rx	CLOGP	ca. de próstata	glioblast oma	melanoma	células normales
α-metoxi-PA	2,17	6	5,8	6	ND
PA	2,05	5	4,3	5	12
α-metil-PA	2,42	2,6	3,8	3,5	12
α-etil-PA	2,77	2,1	2,8	2,2	9
PB	2,89	1	1,8	1	ND
4-cloro-PB	3,30	0,75	ND	0,8	ND
4-yodo-PB	3,85	0,36	0,27	0,22	ND
ND, no determinado					

TABLA 15

Fenilacetato y análogos que contienen sustituciones en el anillo: Relación de CI₅₀ a CLOGP

CI ₅₀ (mM)					
Rx	CLOGP	ca. de próstata	glioblastoma	melanoma	células normales
4-Hidroxi-PA	1,78	7,5	10	10	ND
PA	2,05	5	4,3	5	12
4-fluoro-PA	2,17	2,8	4	2,5	ND
2-metil-PA	2,43	2,5	ND	ND	ND
3-metil-PA	2,45	2,1	ND	ND	ND
4-metil-PA	2,47	2,1	ND	ND	ND
4-cloro-PA	2,48	1	0,9	1,2	3
3-cloro-PA	2,54	1,75	1,7	1,5	7
2-cloro-PA	2,56	2,4	2,1	2,5	ND
2,6-dicloro-PA	2,87	1	0,8	1	ND
4-yodo-PA	3,12	0,6	0,9	1,2	ND
I-naftilacetato	3,16	0,8	0,9	0,8	2,8
ND, no determinado					

El análisis posterior de las relaciones estructura-actividad se basó en el procedimiento de Hansch y Anderson usado para la correlación de los efectos anestésicos y metabólicos de los barbitúricos con sus coeficientes de partición octanol-agua [Hansch, C. y Anderson, S. M. The structure-activity relationship in barbiturates and its similarity to that in other narcotics. J. Med. Chem. 10: 745-753, 1967]. La adaptación de este procedimiento supone que, si la relación es simple, seguirá la ecuación: $\log 1/C = \text{pendiente} \log P + K$. La representación de los valores de $\log 1/CI_{50}$ obtenidos con células prostáticas frente al CLOGP del fármaco (Figura 8) dio como resultado en una recta de ajuste óptimo descrita por la ecuación: $\log 1/CI_{50} = 0,89 \text{ CLOGP} + 0,55$. La pendiente de esta recta (0,89) está en el intervalo de valores observados para las potencias anestésicas de una serie de análogos de barbitúricos. Hansch y colaboradores también estudiaron el efecto del fenilacetato y sus derivados en el crecimiento de plantas. Como se muestra en la Figura 8, el intervalo de concentraciones y el orden de importancia de la inhibición del crecimiento de plantas por análogos del fenilacetato son comparables a la inhibición del crecimiento de células del cáncer prostático por esta misma serie de compuestos.

Para las sustituciones tanto cloro como metilo, la posición *para* es más potente que la posición orto. Además, y a pesar de sus contribuciones casi iguales a la lipofilidad, la sustitución cloro en *para* fue más potente que la metilo. En contraste con derivados que contienen sustituciones en el anillo o en el carbono alfa, los que tienen grupos carboxilo bloqueados mostraron una disminución de la actividad citostática. El éster de metilo del fenilacetato fue la mitad de activo que el del ácido libre (CI_{50} en células prostáticas DU145 8,8 mM frente a 4,1 mM para fenilacetato). Las formas amida también eran menos activas que los compuestos parentales en este sistema experimental, con CI_{50} de 2,0 mM para la fenilbutiramida frente a 1,2 mM para fenilbutirato y 4,8 mM para fenilacetimida frente a 4,1 mM para fenilacetato.

Captación de Fármaco. Una posible función del aumento de la lipofilidad es un aumento de la facilidad con la que los ácidos grasos aromáticos pueden ingresar y cruzar la membrana plasmática así como las membranas de otras organelas. La velocidad de captación de fenilacetato por células tumorales se comparó con la del análogo más hidrófobo, naftilacetato (Tabla 15). Después de 10 minutos, con respecto al fenilacetato, más del doble de naftilacetato había entrado en las células U87 de glioblastoma (la captación del ácido fenilacético fue del 41% de la del ácido naftilacético) indicando que su movimiento por la membrana plasmática fue más del doble de la del fenilacetato. Después de 20 minutos, la cantidad de naftilacetato captado por las células fue solamente un 26% mayor que la del fenilacetato y a los 180 minutos los niveles intracelulares de ambos compuestos eran aproximadamente iguales, sugiriendo que en este momento el flujo de entrada más rápido del ácido naftilacético se equilibró por un flujo de salida igual de rápido. Hubo poca captación adicional y la concentración del fenilacetato en el interior y el exterior de las células fue aproximadamente igual indicando que estas células no acumulan activamente mucho ácido graso aromático.

Inversión fenotípica: Además de causar citostasis selectiva, el fenilacetato induce a las células malignas a someterse a inversión a un fenotipo más benigno. El efecto de los análogos en la biología tumoral se ensayó usando como un modelo las células PC3 prostáticas resistentes a hormonas obtenidas originalmente de una metástasis ósea. Las PC3 muestran varias características de crecimiento *in vitro* que se correlacionan con su comportamiento maligno *in vivo*, incluyendo crecimiento independiente de anclaje (es decir, formación de colonias en agar semi-sólido) y formación de estructuras de tipo "red" cuando se siembran sobre una membrana basal reconstituida (matrigel). La capacidad del fenilacetato y los análogos representativos de producir la pérdida de tales propiedades se resume en la Figura 9. Similar al efecto citostático, la capacidad del fármaco de inducir la inversión a un fenotipo no maligno se correlacionó en gran medida con la lipofilidad calculada de los fármacos. De los compuestos ensayados se observó que el naftilacetato, así como los derivados de fenilbutirato y el fenilacetato con sustituciones de yodo y cloro son los más activos en una base molar. La eficacia relativa de los compuestos para suprimir el crecimiento independiente de anclaje se confirmó usando células de glioblastoma U87 (datos no mostrados).

El resultado destacado es el descubrimiento de que: (a) hay una relación simple entre la lipofilidad de un derivado del fenilacetato y su actividad contra células tumorales humanas y (b) la potencia relativa observada en neoplasias humanas es similar a la documentada en plantas, indicando que el papel de los ácidos grasos aromáticos en la regulación del crecimiento se ha conservado en la evolución.

Hay una evidencia acumulativa que indica que el fenilacetato y los derivados pueden actuar por múltiples mecanismos para alterar la expresión génica y la biología celular. A concentraciones inhibitorias del crecimiento, los ácidos grasos aromáticos podrían alterar el patrón de metilación del ADN, un mecanismo epigenético que controla la transcripción de diversos genes eucariotas. El fenilacetato inhibe la metilación de ADN en células de plantas y de mamífero, y se ha demostrado que tanto el fenilacetato como el fenilbutirato activan la expresión de genes dependientes de metilación de otro modo latentes. La hipometilación del ADN *per se* no es suficiente para inducir la expresión génica. Hallazgos preliminares indican que el fenilacetato, el fenilbutirato y varios análogos activan un receptor nuclear que funciona como un factor transcripcional, de forma interesante, el receptor es un miembro de una superfamilia de receptores nucleares esteroides, cuyos ligandos son ácidos carboxílicos e incluyen inductores de la diferenciación bien caracterizados tales como retinoides.

Además de afectar a la transcripción de genes, los ácidos grasos fenilo pueden interferir con el procesamiento post-traducciona de proteínas inhibiendo la vía del mevalonato (MVA) de la síntesis del colesterol. El mevalonato es un precursor de varios restos isopentenilo requeridos para la progresión por el ciclo celular y de grupos prenilo que modifican un pequeño conjunto de proteínas críticas. El último incluye proteínas G de membrana plasmática y

similares a G (por ejemplo, ras) implicadas en la transducción de señal mitogénica (peso molecular 20-26 kDa) y laminas de envuelta nuclear que juegan un papel clave en la mitosis (44-74 kDa). Los ácidos grasos aromáticos se pueden conjugar con coenzima-A, ingresar en la vía para la prolongación de la cadena e interferir con el metabolismo lipídico en general. Además, los compuestos tales como el fenilacetato pueden asumir una conformación semejante al pirofosfato de mevalonato e inhibir específicamente la utilización del MVA. Recientemente se ha demostrado que la actividad del fenilacetato frente a tejidos de mamífero escasamente diferenciados (células del glioblastoma humano y el cerebro fetal en desarrollo) está asociada a la inhibición de la descarboxilación del MVA y una disminución de la isoprenilación de proteínas. Los tejidos en rápido desarrollo de mamíferos y plantas dependen en gran medida del MVA para la replicación celular. La inhibición de la utilización del MVA por compuestos relacionados con fenilacetato podría ser por tanto responsable en parte de su efecto documentado en tales organismos altamente divergentes.

Ejemplo 7

NaPA en combinación con Flavonoides y Ligninas

Además, el PA y análogos también se pueden usar de forma similar en combinación con flavonoides y ligninas, así como con retinoides como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el PA y la apigenina (un flavonoide) actúan de forma sinérgica para suprimir el crecimiento de células PC3 de carcinoma prostático humano. Se observaron resultados similares cuando se usó el PA en combinación con ácido 9-*cis*-retinoico. El 9-*cis*-RA (y sus precursores, incluyendo el todo-*trans*-RA como se ha discutido anteriormente) activa el receptor nuclear RXR, que se requiere para la estimulación de PPAR (descrito en este documento y en la solicitud en trámite junto con la presente) por el PA y sus análogos.

Las células PC3 se trataron con 1) EtOH 10 μ M (control), 2) PA 4 mM, 3) apigenina 10 μ M, 4) apigenina 10 μ M en combinación con PA 4 mM, 5) 9-*cis*-RA 2 μ M y 6) 9-*cis*-RA 2 pM en combinación con PA 4 mM. Las terapias de combinación mostraron una disminución significativa, potenciada (apigenina/PA aproximadamente un 50% y 9-*cis*-RA/PA aproximadamente un 50%) en las tasas de supervivencia de células PC3.

Además, el flavonoide quercetina, que se conoce que bloquea el flujo de salida del PA de células vegetales, se puede usar en combinación con PA para potenciar las terapias descritas en este documento.

Sección O

Estudios en seres humanos de NaPA y NaPB

Los efectos de inhibición del crecimiento y diferenciación del fenilacetato sódico frente a líneas celulares de tumor hematopoyético y sólido han despertado interés sobre su uso como fármaco anticanceroso. La farmacocinética no lineal, el metabolismo, la toxicidad y la actividad clínica del PA cuando se administra mediante infusión i. v. continua (IIVC) durante 2 semanas se determinaron en primer lugar en un ensayo clínico de fase I. En el mismo el fármaco se administró por IIVC en un intento de mantener la concentración de fármaco en el intervalo asociado a actividad preclínica. En estas condiciones, el fenilacetato mostró una cinética saturable y evidencia de inducción de su propio metabolismo (parámetros farmacocinéticos, media $\pm$ DT: $K_m = 105,1 \pm 44,5$ μ g/ml, $V_{max} = 24,1 \pm 5,2$ mg/kg/h, $V_d = 19,2 \pm 3,3$ l e $IR = 0,0028 \pm 0,003$ h $^{-1}$). Se observó mejora clínica en varios pacientes con cáncer de próstata metastásico independiente de hormonas y glioma maligno que consiguieron concentraciones de fenilacetato sérico de 1-2 mM. Sin embargo se requirieron velocidades de infiltración cercanas a la V_{max} de la enzima metabolizante, para lograr concentraciones de 3 mM o más. Esto a menudo dio como resultado la rápida acumulación del fármaco, asociada a toxicidad neurológica una vez que los niveles de fenilacetato superaron 6 mM. Estas limitaciones condujeron a la investigación de un esquema de dosificación diferente, en el que el fármaco se administró como una infusión de una hora dos veces al día, basándose en la suposición de que las elevaciones en las concentraciones de fenilacetato se podrían toleradas bien si son transitorias y que una dosificación intermitente podría ayudar al control de la acumulación del fármaco.

El protocolo de IIVC sufrió varias modificaciones a lo largo del periodo de 6 meses. En primer lugar, el tamaño de la dosis en embolada inicial se disminuyó de 150 a 60 mg/kg i. v. y la duración de la infusión del bolo, de 2 horas a 30 minutos, después de que se hubieran tratado los primeros tres pacientes. Este cambio dio como resultado concentraciones de fármaco óptimas para la estimación de la farmacocinética (vide infra) del fármaco en un periodo de tiempo de seis horas. En segundo lugar, después de que se hubiera reconocido la naturaleza no lineal de la farmacocinética del fenilacetato (vide infra), se cambió el protocolo de una escalada fija de dosis (niveles de dosis 1 y 2: 150 y 250 mg/kg/día, respectivamente) a un ensayo escalonado guiado por la concentración (niveles de dosis 3 y 4: 200 y 400 μ g/ml, respectivamente). En el último formato, a cada paciente se administró una dosis en embolada i. v. de fenilacetato (60 mg/kg durante 30 minutos) una semana antes de comenzar una IIVC de 14 días del fármaco. Los parámetros farmacocinéticos específicos del paciente estimados a partir de la dosis en embolada se usaron para calcular una velocidad de infusión mantendría la concentración del fenilacetato sérico en el nivel pretendido durante la infusión de 14. Las concentraciones del fármaco séricas se midieron semanalmente, dando lugar a la reestimación semanal de la farmacocinética individual y el ajuste de la dosificación (control adaptativo con retroalimentación).

Mecanismos de Aclaramiento del Fenilacetato. Como se muestra en la Figura 1, el fenilacetato sufrió una rápida conversión a fenilacetilglutamina. En los tres pacientes que recibieron 150 mg/kg de fenilacetato durante 2 horas, la concentración sérica máxima de la fenilacetilglutamina (media $\pm$ DT) fue 224 ± 81 μ g/ml, 325 $\pm$ 72 minutos post-

infusión. Después de bolos de 60 mg/kg, la concentración sérica máxima de fenilacetilglutamina fue $104 \pm 33 \mu\text{g/ml}$ a $86 \pm 33 \text{ min}$. La concentración en plasma de glutamina antes del tratamiento en embolada con fenilacetato fue de $105 \pm 29 \mu\text{g/ml}$ (media $\pm$ DT, $n=16$), similar a los valores descritos en la bibliografía para voluntarios normales. La mayor disminución de los niveles de glutamina en plasma circulante (46%) se observó en un paciente que recibió un

bolo de 150 mg/kg. La excreción molar de fenilacetilglutamina se determinó a partir de la recogida de orina cada 24 horas. Alcanzó el $99 \pm 23\%$ ($n=18$) de la dosis de fenilacetato administrada durante el mismo periodo de tiempo. La recuperación del fármaco libre, no metabolizado fue de solamente el $1,5 \pm 2,4\%$ de la dosis total administrada. Se pudo detectar un fuerte olor a fenilacetato en la ropa de los pacientes y en las manos de los examinadores después del examen físico. Esto sugiere que el fenilacetato también puede excretarse en alguna medida por vía transdérmica.

Distribución de Fenilacetato y Fenilacetilglutamina al LCR. Las circunstancias clínicas requirieron una evaluación del líquido cefalorraquídeo de dos pacientes que tenían cáncer de próstata metastásico y no tenían metástasis en el SNC. El primero había alcanzado concentraciones de fenilacetato y fenilacetilglutamina en estado de equilibrio de 141 y $199 \mu\text{g/ml}$, respectivamente, las concentraciones simultáneas correspondientes en LCR fueron de 74 y $5 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. En el momento del muestreo simultáneo de suero y LCR, el segundo paciente había interrumpido la terapia durante 6 horas después de haber alcanzado una concentración de fenilacetato en suero de $1044 \mu\text{g/ml}$. Las mediciones en suero y LCR fueron 781 frente a 863 gg/ml para fenilacetato y 374 frente a $46 \mu\text{g/ml}$ para fenilacetilglutamina, respectivamente.

Toxicidades clínicas. No se asoció toxicidad a la administración en embolada del fármaco. Las mayores concentraciones séricas máximas se midieron después del bolo de 150 mg/kg durante 2 horas ($533 \pm 94 \text{ pg/ml}$, media $\pm$ DT). La Tabla 16 enumera las concentraciones séricas de fenilacetato medias por nivel de dosis. Si bien las alcanzadas en los niveles de dosis 3 y 4 están cerca de su objetivo, las grandes desviaciones típicas reflejan la incapacidad de mantener las concentraciones séricas de fenilacetato dentro del intervalo deseado, ni siquiera usando control adaptativo con retroalimentación.

La toxicidad relacionada con el fármaco estaba claramente relacionada con la concentración sérica de fenilacetato. Sucieron tres episodios de toxicidad en SNC, limitados confusión y letargia y a menudo precedidos por emesis, en pacientes tratados con los niveles de dosis 3 y 4. Se asociaron a concentraciones de fármaco de 906, 1044 y $1285 \mu\text{g/ml}$ (media: $950 \pm 300 \mu\text{g/ml}$), respectivamente. Los síntomas se solucionaron completamente en el intervalo de 18 horas después de la finalización de la infusión del fármaco en todos los casos.

Actividad Antitumoral. Se observó la estabilización de PSA durante más de 2 meses en 3 de los 9 pacientes con cáncer de próstata tratados con los niveles de dosis 2, 3 y 4 (concentración media de fenilacetato $234 \pm 175 \mu\text{g/ml}$). Un cuarto paciente experimentó una marcada mejora en el dolor óseo y pudo sustituir con un fármaco antiinflamatorio no esteroideo su programa de morfina. Un paciente con glioblastoma multiforme tuvo una mejora de su estado general (un 30% en la escala de Karnofsky), función intelectual y afasia expresiva de más de 5 meses de duración. Si bien no se observaron cambios en el tamaño de la masa tumoral, se documentó una disminución del edema peritumoral por RMN.

En un segundo ensayo clínica de fase I, el PA se administró i. v. dos veces al día (BID) en un intento de minimizar la acumulación del fármaco mientras que se maximizan las concentraciones séricas máximas del fármaco. Se aplicaron veintisiete ciclos de terapia a 18 pacientes con dos niveles de dosis (125 y 150 mg/kg BID durante 14 días). Los estudios farmacocinéticos detallados en 8 pacientes demostraron de manera concluyente que el PA induce su propio aclaramiento en un factor del 44% durante dos semanas. La toxicidad limitada por la dosis consistió en depresión reversible del sistema nervioso central asociada a náusea e hipoacusia. Se observó mejoría clínica en ocho pacientes. Tres de siete pacientes con glioma maligno resistente tenían un estado general mejorado durante hasta 9 meses. Uno tuvo una respuesta parcial y otro una respuesta menor en RMN. También se observó mejoría en cinco de nueve pacientes con cáncer de próstata independiente de hormonas (HIPC). Uno tuvo una disminución de más del 50% de PSA, uno tuvo resolución de coagulación intravascular diseminada y en otro se observó dolor óseo disminuido que había durado más de 1 mes. Dos pacientes mantuvieron un estado general mejorado durante más de 8 meses, y uno de los cuales mostró curación de metástasis osteoblástica. Estos resultados sugieren que el PA tiene actividad en gliomas malignos y HIPC. El programa recomendado para el ensayo de fase II es 125 mg/kg BID (infusión de una hora) dado en ciclos mensuales de 14 días de duración.

Ejemplo 12

Ensayos in vivo con NaPA B. I. D.

Población de pacientes. Cumplían los requisitos para este estudio los adultos con tumores sólidos avanzados resistentes a terapia convencional, un estado general superior al 60% en la escala de Karnofsky, transaminasas hepáticas y bilirrubina normales, creatinina sérica inferior a $1,5 \text{ mg/dl}$ y recuentos normales de leucocitos y plaquetas. El protocolo clínico se revisó y aprobó por el NCI Institutional Review Board y todos los pacientes dieron consentimiento informado por escrito antes de participar en el estudio. Dieciocho pacientes, 15 hombres y 3 mujeres, de una edad media de 54 años (intervalo de 32 a 76) se inscribieron entre julio y octubre de 1993. La distribución de la enfermedad incluía cáncer de próstata metastásico independiente de hormonas (9 pacientes), tumores primarios del SNC (7 pacientes),

cáncer de células renales (1 paciente) y sarcoma (1 paciente). Cuatro pacientes, dos con gliomas y dos con cáncer de próstata, habían recibido tratamiento previo con fenilacetato administrado por IIVC.

Preparación y Administración de Fármaco. Se preparó fenilacetato sódico para inyección (Elan Pharmaceutical Research Co., Gainesville, GA) a partir de polvo de fenilacetato sódico estéril por el Departamento de Farmacia del Centro Clínico, NIH en viales que contenían una concentración de fármaco de 500 mg/ml en agua estéril para inyección, USP. Se añadió hidróxido sódico o ácido clorhídrico para ajustar el pH final en 7,4. Se prepararon dosis de fenilacetato sódico para infundir durante 1 hora en 250 ml de agua estéril para inyección, USP, y se administraron usando una bomba de infusión. El experimento usó el modelo farmacocinético de un compartimento, no lineal y parámetros poblacionales obtenidos de experiencia previa con fenilacetato para estimular el curso de varios programas de dosificación intermitente. El objetivo primario era diseñar uno que expusiera a la mayoría de los pacientes a concentraciones transitorias de fenilacetato superiores a 3 mM y los mantuviera con concentraciones mínimas de aproximadamente 2 mM. Las mismas parecían necesarias para actividad antitumoral *in vitro* y se habían tolerado bien por los pacientes durante hasta 2 semanas. El objetivo secundario era determinar farmacocinéticamente la dosis óptima de fenilacetato para lograr lo anterior y minimizar el número de etapas de escalada en el ensayo comenzando por esa dosis.

El fenilacetato se suministró a dos niveles de dosis: diez pacientes se trataron con 125 y ocho con 150 mg/kg/dosis, BID, durante 14 días consecutivos. Los ciclos de la terapia se repitieron cada 4 semanas. La dosis se aumentó en cohortes secuenciales de al menos tres pacientes. Los pacientes individuales podrían subir de un nivel de dosis al siguiente con ciclos secuenciales suponiendo que no hubieran experimentado toxicidad relacionada con el fármaco y que su enfermedad fuera estable o hubiera mejorado.

Programa de muestreo. Se midieron concentraciones séricas del fármaco dos veces al día en todos los pacientes, inmediatamente antes de y 15 minutos después de la administración de la infusión de 05:00 PM. Para evaluar la posibilidad de que el fenilacetato induce su propio aclaramiento, 8 pacientes se sometieron a un control del nivel de fármaco más intenso los días 1, 2 ó 3 y los días 12, 13 ó 14 de las dos semanas de terapia. En estos pacientes también se obtuvo sangre los minutos 0, 65, 90, 105, 120, 150, 180, 210, 240, 300 y 360 desde el inicio de la infusión de 08:00 AM. Esto permitió realizar una comparación entre las ABC generadas a partir de dosis idénticas de fenilacetato al comienzo y al final de la terapia, reflejando cualquier diferencia un cambio en el aclaramiento del fármaco durante este periodo de tiempo.

Procedimiento Analítico. La sangre se extrajo en tubos Vacutainer® de vidrio común y se refrigeró. Se separó el suero y se congeló a -85°C en un intervalo de 12 horas desde la recogida. El procedimiento de HPLC para medir concentraciones séricas de fenilacetato y fenilacetilglutamina se describe en otra parte de este documento. En síntesis se añadieron 100 µl de ácido perclórico al 10% a 200 µl de suero para precipitar las proteínas. Después de la centrifugación se neutralizó el sobrenadante con 25 µl de una solución de bicarbonato de potasio al 20%. Después de una segunda centrifugación se inyectaron 20 µl de sobrenadante en una columna C-18 de 300 X 3,4 mm calentada a 60°C. La elución se realizó con un gradiente creciente de acetonitrilo en agua del 5% al 30% durante 20 minutos. Se siguió su progreso controlando la absorbancia de UV a 208 nm. Los tiempos de elución característicos para fenilacetato y fenilacetilglutamina, en estas condiciones, fueron de 17,1 y 9,8 minutos, respectivamente.

Determinación de las Respuestas al Tratamiento. Un médico vio a los pacientes en consulta al menos una vez al mes en el NCI. Antes de cada ciclo de terapia se determinaba el estado de respuesta de los tumores malignos diferentes del cáncer de próstata y tumores primarios del SNC usando criterios anatómicos convencionales. Para pacientes con cáncer de próstata se usaron los criterios de los ensayos NPCP y criterios publicados de la disminución del PSA. Se obtuvo una escintigrafía ósea con tecnecio cada tres meses si inicialmente diera positivo o ante la presencia de nuevos síntomas óseos. La evaluación de pacientes con gliomas se complica por la frecuente multicentricidad microscópica del tumor, la variabilidad del edema asociado al tumor y su respuesta a terapia con esteroides y factores técnicos que impiden usar la intensidad de la potenciación por gadolinio en RMN para determinar la respuesta del tumor. Por estas razones, se prestó especial atención a cambios en el estado general y a requerimientos de esteroides, que se evaluaron en cada consulta. Se definió respuesta completa la desaparición total de lesiones en RMN (evaluación realizada en dos planos diferentes) y la retirada de esteroides. Se definió la respuesta parcial por criterios anatómicos convencionales, ausencia de deterioro del estado general y requerimiento estable o decreciente de corticoesteroides. Se definió la respuesta menor de forma similar usando el 25% como el límite mínimo de disminución de tamaño. Se definió la enfermedad progresiva por criterios anatómicos, deterioro del estado general en al menos 20 puntos en la escala de Karnofsky o la necesidad de aumentar las dosis de esteroides para mantener la función. Se definió la estabilización de la enfermedad la ausencia de un aumento o una disminución significativa (más del 25%) del tamaño del tumor mientras que el paciente conserva o mejora su estado general en su nivel pre-tratamiento. Para La estabilización de la enfermedad en estos pacientes se tenía que conservar durante al menos tres meses para ser puntuada como significativa.

Procedimientos Estadísticos. Para determinar si el fenilacetato induce su propio aclaramiento, se compararon las ABC después de una dosis única del fármaco al comienzo y al final de la terapia con PA en 8 pacientes con el ensayo de rango para datos apareados de Wilcoxon.

Simulación Farmacocinética y Hallazgos Clínicos. Se elaboraron varios programas de dosificación intermitente usando los parámetros farmacocinéticos obtenidos de un ensayo previo con fenilacetato. Se modeló el curso farmacocinético de un hombre de 70 kilos al que se le había administrado fenilacetato a 125 mg/kg/dosis BID (08:00 AM y

05:00 PM). La simulación predijo niveles máximos entre 1,5 y 3,5 mM con concentraciones mínimas inferiores a 1 mM y sin acumulación de fármaco (intervalos de confianza del 95%).

El análisis de los niveles de fármaco en 18 pacientes muestra concentraciones séricas máximas (media $\pm$ DT) de 3,0 $\pm$ 1,2 mM (n = 10) y 3,7 $\pm$ 0,8 mM (n = 8) en ambos niveles de dosis. Las concentraciones mínimas correspondientes fueron 0,2 $\pm$ 0,2 mM y 0,7 $\pm$ 0,5 mM, respectivamente. Como media, los pacientes pasaron el 40% del tiempo de su tratamiento con una concentración por encima de 2 mM. La acumulación de fármaco asociada a toxicidad neurológica (mayor concentración de fenilacetato: 7,3 mM) se produjo en un único paciente tratado con el segundo nivel de dosis. Los parámetros farmacocinéticos de la población se determinaron ajustando un modelo no lineal de un compartimento a cada dosificación de paciente y a los datos de concentración del fármaco, usando como parámetro inicial las estimaciones de los valores de parámetro medios que se describen en otra parte de este documento. Los parámetros farmacocinéticos de cada paciente individual después se le promediaron y expresaron como valores de parámetro medios con desviación típica asociada:

$$K_m = 112 \pm 34 \mu\text{g/ml},$$

$$V_{\max} = 25,8 \pm 5,0 \text{ mg/kg/h y}$$

$$V_d = 21,4 \pm 4,6 \text{ l.}$$

Aclaramiento de Fenilacetato. La excreción molar de fenilacetilglutamina se determinó a partir de muestras de orina recogidas durante 24 horas. Representó 76 $\pm$ 15% (media $\pm$ DT, n = 24) de la dosis de fenilacetato suministrada durante el mismo periodo de tiempo. La recuperación de fármaco libre, no metabolizado fue del 3 $\pm$ 1% de la dosis total administrada.

Inducción del Aclaramiento del Fenilacetato. La hipótesis de que el fenilacetato induce su propio aclaramiento se ensayó comparando las ABC después de la infusión AM de fenilacetato al comienzo y al final de la terapia en 8 pacientes. Todos mostraron una disminución de la ABC, con un valor medio del 44 $\pm$ 27% (valor p = 0,008) entre los dos extremos de cada ciclo de terapia.

Evaluación Clínica de Actividad Antitumoral. Tres de siete pacientes con tumores cerebrales mostraron evidencia de actividad antitumoral o estabilización de la enfermedad. Uno tuvo una respuesta parcial acompañada por mejora subjetiva en la memoria a corto plazo. Esta respuesta se confirmó por evidencia radiográfica de metástasis osteoblástica en curación (6 meses de seguimiento) a pesar de concentraciones séricas crecientes de PSA durante el mismo periodo de tiempo en un hombre de 57 años con cáncer de próstata metastásico independiente de hormonas. También fue capaz de reducir su dosis diaria de corticosteroides en un 50%, de 8 a 4 mg de dexametasona. Dos pacientes que presentaron inicialmente confusión habían recibido fenilacetato por IIVC antes de tratarse con el programa intermitente. Uno tuvo una respuesta menor documentada radiológicamente después del cambio de programa, mientras que el tamaño del tumor permaneció estable en el segundo. Ambos conservaron una mejora del 20 y el 30% del estado general durante seis y siete meses, respectivamente. Su dosis de corticosteroides se mantuvo constante a lo largo de su tratamiento.

Cinco de nueve pacientes con cáncer de próstata independiente de hormonas mostraron mejoría clínica. Uno experimentó una disminución de más del 50% en PSA mantenida durante un mes y conservó un estado general del 100% en la escala de Karnofsky durante más de cinco meses. Uno con coagulación intravascular diseminada asociada a tumor (tiempo de protrombina prolongado, fibrinógeno bajo, recuento de plaquetas normal) dejó de tomar flutamida al mismo tiempo que comenzó con fenilacetato. Sus parámetros hematológicos se normalizaron durante la primera semana de terapia mientras que su estado general mejoró en un 30%, debido a la disminución del dolor óseo. Dos que ya se habían tratado con fenilacetato administrado por IIVC con una mejora asociada en el dolor óseo y el estado general conservaron la misma durante cinco meses adicionales. Uno de ellos también tuvo evidencia de metástasis osteoblástica en curación con TAC. La comparación de RMN cerebral potenciada por gadolinio pre-tratamiento en un paciente con glioblastoma multiforme recurrente frente a RMN potenciada por gadolinio post-tratamiento después de 3 ciclos de fenilacetato (150 mg/kg BID), confirmó esta respuesta parcial. Esta evidencia de metástasis en curación continuó a pesar de concentraciones séricas de PSA crecientes de forma constante de 1,0 a 80 ng/ml a lo largo del mismo periodo de tiempo. Finalmente, un paciente presentó mitigación subjetiva de dolor óseo durante 1 mes.

Toxicidades Clínicas. La toxicidad neurológica reversible fue el efecto secundario más común asociado a la administración de fenilacetato dos veces al día. Todos los pacientes experimentaron somnolencia leve (grado I) (concentración sérica máxima, media $\pm$ DT: 2,9 $\pm$ 0,5 mM). Tres pacientes que recibieron 150 mg/kg BID desarrollaron neurotoxicidad limitada por dosis (concentraciones séricas, media $\pm$ DT: 5,3 $\pm$ 1,7 mM). Uno con glioblastoma multiforme experimentó desorientación espacial transitoria e hipoacusia, asociadas a la acumulación de fármaco (concentración de fenilacetato: 7,3 mM). Otro con astrocitoma anaplásico experimentó somnolencia de grado II que se relacionó temporalmente con concentraciones máximas de fenilacetato (concentración máxima media: 4,7 mM). Un tercer paciente con cáncer de próstata que padecía neuropatía sensorial inducida por suramina experimentó un deterioro gradual de su estado a lo largo de los primeros diez días de la administración de fenilacetato (niveles máximos y mínimos, media+DT: 3,9 $\pm$ 0,4 y 0,9 $\pm$ 0,4 mM), momento en el que se interrumpió la terapia. En este paciente, los efectos secundarios mejoraron gradualmente a lo largo de 3 meses.

Tres pacientes con un historial de angina de pecho, taquicardia supraventricular o palpitaciones asociadas a prolapso de válvula mitral describieron una exacerbación reversible de sus síntomas habituales durante la infusión de

fenilacetato. Esto probablemente estaba relacionado con desplazamientos importantes de fluidos inducidos por el alto contenido de sodio de la formulación del fármaco. Ninguno de tales síntomas se observó en pacientes sin alteración cardiovasculares.

Este ensayo se diseñó para superar el problema de la rápida acumulación de fármaco asociada al suministro de altas dosis de fenilacetato por IIVC. El objetivo era lograr concentraciones máximas de fenilacetato transitorias en el intervalo que se había observado que era preclínicamente activo (2 mM) y dejar entre cada dosis de fenilacetato tiempo suficiente para la eliminación del fármaco. La información farmacocinética obtenida del primer ensayo de fenilacetato se usó para estimular varios programas de dosificación intermitentes. Se pronosticó que la administración de 125 mg/kg/dosis de fenilacetato dos veces al día (con 9 horas de separación) como infusiones de 60 minutos, lograría concentraciones séricas del fármaco entre 3 y 5 mM sin acumulación del fármaco, en más del 95% de los pacientes. Por lo tanto, esta dosis se seleccionó como el punto de partida para el ensayo.

Los resultados confirman que la mayoría de los pacientes tratados con 125 y 150 mg/kg/dosis de fenilacetato logran concentraciones séricas máximas de fármaco en el intervalo de 3-5 mM. Ningún paciente tratado con el primer nivel de dosis experimentó acumulación indeseable del fármaco, lo que sucedió en 1 de 8 pacientes tratados con el nivel mayor. La exposición de los pacientes a concentraciones potencialmente activas de fenilacetato fue igual al 40% del tiempo total de su tratamiento. La precisión de la simulación farmacocinética eliminó exitosamente la necesidad de múltiples etapas de escalada y permitió que las preguntas clínicas se pudieran responder rápidamente.

El ensayo permitió la caracterización de la toxicidad de fenilacetato con respecto a niveles máximos del fármaco. El nivel de dosis de 125 mg/kg se asoció a una concentración sérica máxima media de 3,0 mM y toxicidad neurocortical de grado I (somnia). La relación temporal entre la infusión de fármaco y el comienzo de somnolencia se observó en todos los pacientes tratados con este nivel de dosis. La regla fue la recuperación gradual entre cada infusión. El segundo nivel de dosis (150 mg/kg BID) se asoció a neurotoxicidad de grado I en cinco pacientes (concentración sérica máxima media: 3,7 mM) y toxicidad más grave en tres pacientes cuya concentración máxima de fármaco media era 5,3 mM. Con excepción del deterioro observado en un paciente con neuropatía sensorial inducida por suramina pre-existente, la neurotoxicidad del fenilacetato había sido aguda y reversible.

La evidencia para la inducción del aclaramiento de fenilacetato está disponible a partir del primer ensayo de fenilacetato. Sin embargo, la demostración fue indirecta debido a frecuentes ajustes de la dosificación del fármaco dentro de cada ciclo de terapia. Con el actual programa de dosificación fija se demostró un 44% de disminución media en la ABC asociada a idénticas dosis de fármaco suministrado al comienzo y al final de las dos semanas de tratamiento. Esto verifica la hipótesis de que el PA induce su propio aclaramiento mediante la enzima hepática fenilacetil Coenzima A:glutamina aciltransferasa. La inducción del metabolismo no se sostiene después de que se haya interrumpido el tratamiento, prestando soporte adicional a la hipótesis de que el metabolismo del fenilacetato es auto-inducido. La observación de la autoinducción del aclaramiento es relevante para la duración óptima de la terapia con fenilacetato y la posible necesidad de modificación de la dosis a lo largo del tiempo.

Las respuestas parciales y menores observadas en pacientes con gliomas malignos no se esperaban de un agente de diferenciación que provoca citostasis *in vitro*. Sin embargo, hay evidencia (como se describe en este documento) de que el fenilacetato inhibe la vía del mevalonato de la síntesis de colesterol, en la que se basa de forma predominante la astroglioma maligna para su crecimiento. Esto podría provocar muerte celular y tamaño del tumor disminuido. Un mecanismo alternativo se refiere al agotamiento de glutamina circulante, una fuente principal de energía para diversos tipos de células tumorales. El metabolismo del fenilacetato produce fenilacetilglutamina y causa disminuciones significativas de glutamina plasmática después de una infusión rápida. A este respecto, si bien la administración repetida de fenilacetato no se asoció a disminuciones sostenidas de las concentraciones de glutamina plasmáticas, un paciente de 70 kg que recibe 125 mg/kg/dosis dos veces al día, excretaría más de 90 moles de glutamina por día como fenilacetilglutamina urinaria. Hasta el momento no se sabe si esto se refleja en el sitio del tumor. La evaluación de la respuesta del tumor en pacientes tratados con agentes de diferenciación puede ser problemática. La dificultad es especialmente aguda en pacientes con cáncer de próstata independiente de hormonas, para los que se ha propuesto PSA como la mejor herramienta de seguimiento disponible. Dado que la producción de PSA es específica de órgano y está directamente correlacionada con el grado de diferenciación del tumor, la inversión fenotípica inducida por el fenilacetato podría estar potencialmente asociada a niveles séricos crecientes del marcador. Esto convertiría el PSA en clínicamente inútil como un marcador de la carga de la enfermedad y enfatizaría el papel de los criterios anatómicos más tradicionales. Desafortunadamente, los últimos son inapropiados para evaluar la gran mayoría de pacientes con cáncer de próstata avanzado que no tienen metástasis en tejidos blandos. Por lo tanto, se usarán criterios anatómicos convencionales y puntuaciones del estado general (incluyendo el alivio de dolor) para describir las respuestas hasta que se disponga de más experiencia con PSA en este contexto. Aplicando estas directrices, cinco de nueve pacientes con cáncer de próstata metastásico, independiente de hormonas parecen haberse beneficiado clínicamente de la terapia con fenilacetato.

El fenilacetato suministrado a una dosis de 125 mg/kg BID durante dos semanas consecutivas se tolera bien y está asociado a actividad antitumoral en pacientes con gliomas de grado alto y cáncer de próstata avanzado.

In vivo, el PA se conjuga con glutamina para formar fenilacetilglutamina (PAG). Sin embargo, el PA tiene un olor desagradable que limita la aceptación por el paciente. El fenilbutirato (PB) es un compuesto inodoro que también posee actividad *in vitro* (de 0,5 a 2 mM) y se piensa que se somete a una rápida conversión a PA mediante β -oxidación *in vivo*.

Se realizó un estudio de fase I para examinar la farmacocinética (PK) de PB y caracterizar la disposición de los dos metabolitos (PA y PAG). Catorce pacientes con cáncer (edad media $51,8 \pm 13,8$ años) recibieron una infusión de PB de 30 min en tres niveles de dosis (600, 1200 y 2000 mg/m²). Se obtuvieron muestras de sangre seriadas y una recogida de orina de 24 horas. Las muestras se ensayaron mediante HPLC (CV < 10%). Se desarrolló un modelo para describir de manera simultánea la PK de los tres compuestos usando un ADAPT II. Los datos se modelaron como equivalentes molares.

El modelo ajusta bien los datos como se demuestra por los coeficientes medios ($\pm$ D. T.) de determinación (r^2) para PB, PA y PAG que fueron $0,96 \pm 0,07$, $0,88 \pm 0,10$ y $0,92 \pm 0,06$, respectivamente. El % de CV intrapaciente alrededor de los estimadores de parámetro fue bajo (intervalo del 87,2% al 33,5%). El PB logró concentración máxima en el intervalo de actividad tumoral *in vitro* y mostró eliminación saturable ($K_m = 34,1 \pm 18,1$ μ g/ml y $V_{max} = 18,1 \pm 18$ mg/h/kg). El metabolismo fue rápido; el T_{max} para PA y PAG fue 1 y 2 horas, respectivamente. La conversión de PB a PA fue extensa ($80 \pm 12,6\%$), pero la concentración sérica de PA fue baja debido a la rápida conversión posterior a PAG. La relación PB de ABC/PA de ABC fue 2,25. El PB, por tanto, muestra actividad como un agente terapéutico independiente, no necesariamente solamente como un profármaco de PA.

Sección P

Alteraciones por NaPA Y NaPB del metabolismo lipídico

El NaPA ha mostrado capacidad uniforme para inducir cambios bioquímicos relacionados con el metabolismo lipídico. Tal actividad es valiosa para el tratamiento de trastornos relacionados con el metabolismo lipídico incluyendo cáncer y cardiopatías.

Como se ha discutido previamente, el NaPA y sus derivados activan el receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR). El PPAR regula la expresión de enzimas clave implicadas en el metabolismo lipídico tales como acil-CoA oxidasa y la familia de enzimas del citocromo P450IV. Otros agentes son capaces de activar el PPAR, por ejemplo, ácidos grasos y fármacos hipolipémicos tales como derivados de ácido fibrato (clofibrato). Los fármacos en este grupo han sido altamente eficaces para disminuir los niveles de triglicéridos séricos y por lo tanto se usan ampliamente para disminuir el nivel de lipoproteínas aterogénicas asociadas a mayor riesgo de arteriopatía coronaria.

Después del tratamiento con PA las células de glioma acumulan lípidos. Por tanto, las células cancerosas dependen de los ácidos grasos libres para cierto metabolismo energético. En pacientes tratados con PA y PB hay una disminución de lípidos del 30 al 50%. La capacidad de PA de disminuir el nivel de lípidos se demuestra en varios tipos de cáncer tratados con 300-350 mg/kg/día (IV) de NaPA. Tabla 17. Estos pacientes mostraron una disminución del 30-60% en los niveles de triglicéridos (TG) durante la terapia. Por ejemplo: El paciente S. L. mostró niveles de TG disminuidos de 169 ± 5 mg/dl a 75 ± 21 mg/dl durante un curso de 14 tratamientos IV con 350 mg/kg/día de PA. Dos semanas después de que se hubiera interrumpido el tratamiento, los niveles de TG se recuperaron y alcanzaron 185 mg/dl. En otros pacientes se observaron cambios similares. Véase la Tabla 17.

Tabla 17: Nivel de Triglicéridos Séricos Después del Tratamiento con PA

Paciente	TG Antes	TG Después
1. S. L.	169	75
2. S. G.	260	144
3. H. L.	295	135
4. L. A.	228	143

Parece por tanto que PA y PB estimulan el PPAR (aumento de peroxidación y disminución de síntesis de ADN). Además, dado que PA/PB también inhibe la vía del mevalonato (véase anteriormente) que disminuye la prenilación de proteínas (tales como proteína ras, proteínas G y laminas nucleares), el PA actúa disminuyendo la síntesis de colesterol antes de la síntesis de ADN. Una ras con prenilación reducida no podrá activar una señal de proliferación. Por tanto, como se ha señalado anteriormente, los inhibidores de HMG CoA reductasa, por ejemplo, lovastatina, proporcionan una combinación sinérgica con PA/PB medida por invasividad y metástasis.

Además, la actividad reductora de TG del PA carece esencialmente de efectos adversos y es tan eficaz o más como la del clofibrato y sus derivados (Olsson y col., *Atherosclerosis* 27: 279-297, 1977).

Sección Q

Inducción de HbF por ácido fenilacético y sus derivados en células malignas y no malignas

Capacidad general de NaPA y sus derivados para inducir producción de HbF. Se ha ensayado la capacidad de la administración oral de 4-fenilbutirato sódico de aumentar la producción de hemoglobina fetal. A tal efecto se midió el porcentaje de glóbulos rojos que contenían hemoglobina fetal (células F) mediante ensayos inmunofluorescentes por

ES 2 303 624 T3

flujo citométrico de célula única en 15 pacientes (7 mujeres y 8 varones) con trastornos hereditarios del ciclo de la urea que habían recibido terapia de 4-fenilbutirato sódico de 5 a 65 meses. Para determinar las diferencias en niveles bajos de hemoglobina fetal en personas sin anemia, las mediciones del porcentaje de células F son más precisas que las mediciones convencionales de hemoglobina fetal como un porcentaje de hemoglobina total. El porcentaje medio de células F fue significativamente mayor en los pacientes que en sujetos normales:

N° de Paciente	Edad años	Dosis de Fenilbutirato g/kg/día	Célula F*
1	29	0,30	9,4
2	11	0,67	20,4
3	6	0,62	0,5
4	5	0,48	6,5
5	2	0,58	22,7
6	13	0,46	7,7
7	2	0,38	11,8
8	11	0,41	1,9
9	6	0,27	1,9
10	5	0,62	2,3
11	6	0,65	21,1
12	21	0,29	1,7
13	3	0,47	7,6
14	6	0,64	40,5
15	2	0,63	29,7
Pacientes,	.	-	12,4 ± 3,1**
media ± ET			
Sujetos	.	-	3,1 ± 0,2
normales,			
media ± ET			

*Las células F se midieron con una técnica citométrica de flujo que cuenta el porcentaje de células F en un total de 10.000 glóbulos rojos. La diferencia entre mediciones repetidas fue menor del 10 por ciento.

**P = 0,005 por el ensayo de dos muestras de Kolmogorov-Smirnov para la comparación de los valores de células F en los 15 pacientes con trastornos del ciclo de la urea y los valores en 293 adultos normales. El porcentaje de células F alcanza el intervalo de valores hallados en adultos normales aproximadamente a los dos años de edad.

Ejemplo 13

Estudio in vitro de respuestas a NaPA/NaPB de anemia de células falciformes y beta-talasemia

Se realizó un estudio *in vitro* con células obtenidas de pacientes con enfermedad de células falciformes homocigótica (SS) o B-talasemia (B-tal) que habían ingresado en el Centro Clínico del National Institutes of Health (NIH) para una evaluación rutinaria o donantes de sangre normales del Department of Transfusion Medicine (NIH). Se obtuvieron aproximadamente 20-25 ml de sangre para cultivos de eritrocitos. Se hizo un diagnóstico de SS o B-tal sobre la base de: (1) electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa alcalina y azúcar de citrato ácido; (2) examen de sangre periférica; y ocasionalmente (3) análisis de ADN y ARN de aspirados de médula ósea. Cuando fue posible, el diagnóstico se confirmó por estudios familiares. Los perfiles hematológicos de rutina se realizaron con un Coulter Modelo S.

Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron por centrifugación sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque y se cultivaron durante 7 días (fase I) en un medio esencial mínimo alfa suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10% (ambos de GIBCO, Grand Island, NY), 1 μ g/ml de ciclosporina A (Sandoz, Basel, Suiza) y medio acondicionado al 10% recogido de 5637 cultivos de carcinoma de vejiga (Myers CD, Katz FE, Joshi G, Millar JL: A cellular line secreting stimulating factors for CFU-GEMM culture. Blood 64:152, 1984). En la fase II se recultivaron las células no adherentes en medio alfa suplementado con FCS al 30%, albúmina sérica bovina desionizada al 1%, 2-mercaptoetanol 1 x 10⁵, glutamina 1,5 mM (a menos que se indique lo contrario), dexametasona 1 x 10⁶ M y 1 U/ml de Epo recombinante humana (Ortho Pharmaceutical Co., Raritan, NJ). Estos cultivos produjeron hasta 10⁶ eritrocitos por mililitro de sangre. La viabilidad celular se determinó mediante exclusión con Azul Tripano. Se disolvieron ácido fenilacético, ácido 4-fenilbutírico, ácido *p*-hidroxifenilacético, ácido *p*-clorofenilacético y ácido butírico (Sigma, St. Louis, MO) en agua destilada y se llevaron hasta pH 7,0 por la adición de NaOH. Se obtuvieron 5-Azacidina e hidroxureasa de Sigma y PAG se obtuvo de S. Brusilow (Johns Hopkins, Baltimore, MD).

La diferenciación se evaluó morfológicamente mediante la preparación de portaobjetos de citocentrifugado teñidos con benzidina alcalina y Giemsa. La cantidad de células que contenían Hb se determinó mediante el procedimiento de benzidina-HCl (Orkin SH, Harosi FL, Leder P: Differentiation of erythroleukemic cells and their somatic hybrids. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 72:98, 1975). Las Hb se caracterizaron y cuantificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de intercambio catiónico de lisados celulares como se ha descrito previamente (Huisman TH: Separation of hemoglobins and hemoglobin chains by high performance liquid chromatography. J Chromatography, 418:277, 1987). La Hb total en los lisados preparados a partir de un número conocido de células que contenían Hb (positivas a benzidina) se midió usando el procedimiento de tetrametilbenzidina (kit de Sigma, N° de Catálogo 527) o mediante HPLC de intercambio catiónico (midiendo el área total bajo el cromatograma). Se usaron como referencia soluciones de Hb patrón (Isolab, Inc., Akron, OH). La Hb celular media (MCH) se calculó dividiendo el contenido de Hb total del lisado por el número de células positivas a benzidina.

El ARN citoplasmático se separó en geles de agarosa-formaldehído al 1%. Se describieron el aislamiento del ARN, la electroforesis en gel, la transferencia sobre membranas Nytran (Schleicher & Schuell, Inc., Keene, NH), la hibridación con sondas de ADN radiomarcadas y la autorradiografía (película de rayos X Kodak XAR5) [Samid D, Yeh A, Presanna P: Induction of erythroid differentiation and fetal hemoglobin production in human leukemic cells treated with phenylacetate. Blood, 80: 1576, 1992]. Las sondas de ADNc de globina humana incluían JW101 (alfa), JW102 (beta) y un fragmento EcoRI/HindIII de 0,6 kb del extremo 3' del gen de gamma-globina G humana. Las sondas se marcaron con [³²P]dCTP (New England Nuclear, Boston, MA) usando un kit de marcación de ADN con cebadores al azar (Boehringer, Mannheim, Alemania).

Resultados. La adición de NAPA o NaPB a cultivos de eritrocitos en fase II dio como resultado una proliferación celular reducida sin cambio aparente en la viabilidad celular. La citostasis se asoció a una disminución de la Hb total producida por cultivo; sin embargo, tanto el contenido de Hb por célula (MCH) como la proporción de HbF (% de HbF) aumentaron después del tratamiento (Figura 2). El alcance de los cambios observados era dependiente de la dosis y del tiempo: cuanto antes se añadieran los fármacos durante la segunda fase de crecimiento, mayor era el aumento del % de HbF, sin embargo, las producciones de las células disminuyeron de manera proporcional. Por ejemplo, la adición de NaPA 5 mM a precursores normales el día 2 produjo una disminución de aproximadamente el 90% en el número de células junto con un aumento del % de HbF de un factor 12 determinado el día 13. Cuando el tratamiento se inició el día 67, el número de células disminuyó en un 60% comparado con los controles y el % de HbF aumentó en un factor de 3,3. Para obtener suficientes células para posteriores análisis, los experimentos posteriores implicaron la adición de fármacos los días 6-7 y las células se recogieron el día 13. En estas condiciones, los resultados se reprodujeron en cultivos obtenidos de 6 donantes normales y 4 pacientes con anemia falciforme y 4 pacientes con B-tal. El NaPA (5 mM) y el NaPB (2,5 mM) produjeron un aumento significativo tanto de la MCH (38-100%) como de la proporción de HbF producida. En el caso de un paciente con SS homocigótica, el % de HbF se elevó 2,0-4,1 veces (media 3,0) con NaPA 4 mM y 3,2-5,6 veces (media 4,0) con NaPB 2,5 mM. Lo último se asoció a una disminución de los niveles de HbS del 12 $\pm$ 3% sin cambios en HbA₂ (Figura 3).

Como en células K562, la producción aumentada de HbF por NaPA o NaPB en cultivos primarios de células normales o SS parece deberse a regulación pre-traducciona de la expresión de gamma-globina. El análisis de la transferencia de Northern mostró un aumento dependiente de dosis (de hasta cinco veces) en los niveles del estado en

ES 2 303 624 T3

equilibrio del ARNm de gamma globina, acompañado de una ligera disminución (menos de dos veces) de la cantidad de transcritos de beta globina. No hubo cambios en la expresión de alfa globina.

El PAG, el metabolito final tanto de NaPB como de NaPA, se forma por conjugación de fenilacetato con glutamina con excreción posterior en la orina. Se ha observado que la PAG es inactiva en la proliferación de eritrocitos y la acumulación de HbF. El agotamiento de glutamina de los eritrocitos no malignos no tuvo efectos sobre el crecimiento celular o la producción de HbF, ni potenció la eficacia de NaPA.

También se ensayó el efecto de NaPA con otros fármacos. Cuando se usó solo en cultivos obtenidos de donantes normales (niveles base de HbF del 0,8-2,0%), el NaPA (5 mM) y la hidroxiureasa (0,05 mM) aumentan el % de HbF 3,5 y 2,0 veces, respectivamente; la combinación de ambos dio como resultado un aumento de 4,7 veces de la HbF. El NaPA también aumentó la estimulación de HbF mediante butirato (0,5 mM) (de 3,1 a 7,15 veces) y de la 5-Azaciditina (2 uM) (de 2,5 a 6,6 veces). Estos resultados indican que el NaPA cuando se añade a dosis subóptimas, no tóxicas de otros fármacos, puede potenciar la producción de HbF con citostasis significativa y sin cambios significativos en la viabilidad celular.

Como se ejemplifica a continuación en la Tabla 18, el tratamiento de combinación que comprende la administración de NaPA (o un derivado farmacéuticamente aceptable del ácido fenilacético) simultáneamente con hemina, un conocido estimulador de la producción de HbF, aumenta de manera sinérgica la inducción de diferenciación de eritrocitos, como se indica por el aumento del número de células positivas a benzidina y la producción de HbF. En células K562, el intervalo de aumento de la producción de HbF con este tratamiento de combinación varió de 1,5 a 5 veces con respecto al producido por el tratamiento con PA 10 mM solo. Además, el tratamiento con NaPB en combinación con hemina también dio como resultado sinergia clásica. También se obtuvieron resultados similares con PB en células primarias progenitoras de eritrocitos no malignas. En todos los casos, el tratamiento con ambos fármacos se mantuvo durante 4-6 días antes la medición de la HbF.

TABLA 18

Estimulación de HbF por NaPA en combinación con hemina - modelo K562

R_x	% de pos. a Benzidina	Hb pg/célula	Viabilidad
CONTROL	>0, 01	0,26	97
NaPA (10 mM)	1,6-3,1	0,91	96
NaPA (10 mM) + H	25,4-32,6	4,03	92
NaPA (5 mM) + H	12,6	2,34	99
NaPA (2,5 mM) + H	8,1	1,95	94
HEMINA (20 µM)	2,9	1,04	98
CONTROL	2,1	0,65	97
NaPA (2,5 mM)	2,6	0,91	97
NaPA (5 mM)	7,7	1,04	97
NaPA (10 mM)	14,3	nd	96
HEMINA (20 µM)	13,8	2,34	nd
NaPA (5 mM) + H	42,3	5,2	97

Sección R

Modos de administración del fármaco

5 El NaPA (o derivados del PAA) puede administrarse por vía local o por vía sistémica. La administración sistémica significa cualquier modo o vía de administración que provoque niveles eficaces de ingrediente activo presente en la sangre o en un sitio alejado del sitio de la administración de dicho ingrediente activo.

10 La formulación farmacéutica para administración sistémica de acuerdo con la invención se puede formular para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, oral, nasal, enteral, parental, intravesical o tópica. En algunos casos se puede usar simultáneamente una combinación de tipos de formulación para lograr la administración sistémica del ingrediente activo.

15 Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen cápsulas de gelatina dura o blanda, grageas, píldoras, comprimidos (incluyendo comprimidos con revestimiento), elixires, suspensiones y jarabes o inhalaciones.

Las formas de dosificación sólidas, además de las formuladas para administración oral, incluyen supositorios rectales.

20 Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en la forma de un implante.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen cremas, geles, gelatinas, mucílagos, pastas y ungüentos.

25 Las soluciones inyectables adecuadas incluyen soluciones inyectables intravenosas, subcutáneas e intramusculares. Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en la forma de una solución de infusión o como un inhalador o aerosol nasal.

30 Los compuestos de la presente invención también se pueden usar de manera concomitante o en combinación con modificadores de la respuesta biológica seleccionados, por ejemplo, interferones, interleucinas, factor de necrosis tumoral, antagonistas de glutamina, hormonas, vitaminas, así como agentes anti-tumorales y factores de crecimiento hematopoyético, que se han discutido anteriormente.

35 Se ha observado que el NaPA es ligeramente maloliente. Por lo tanto, puede ser preferible administrar este compuesto en presencia de cualquiera de los excipientes enmascaradores de olor farmacéuticamente aceptables o como su precursor fenilbutirato (o un derivado o análogo del mismo) que no tenga olor desagradable.

40 El PAA y sus derivados farmacéuticamente aceptables que se vayan a usar se pueden preparar fácilmente utilizando materiales farmacéuticos disponibles en la técnica y se pueden preparar por procedimientos establecidos. Las siguientes preparaciones son ilustrativas de la preparación de las formas de dosificación de la presente invención, y no se deben considerar una limitación de la misma.

Ejemplo 14

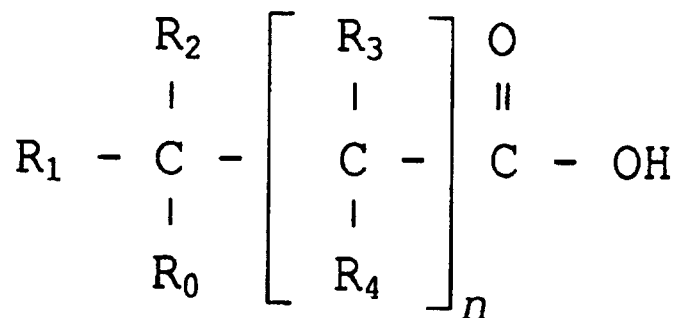
45 *Tratamiento intravesical*

La aplicación local de PA/PB o un derivado/análogo a una superficie corporal, tal como una superficie de mucosa o en el interior de una cavidad corporal, tal como la vejiga, el riñón, el útero, la vagina, etc., se puede usar para prevenir o tratar una patología que implique dicha superficie o cavidad. De esta forma, el PA se puede dirigir selectivamente hacia la superficie o cavidad particular para mantener una concentración de PA relativamente alta en ese sitio en comparación con otras partes del cuerpo.

55 Por ejemplo, el cáncer de vejiga se puede tratar con medios intravesicales. El paciente con cáncer de vejiga puede abstenerse de alimento y agua durante un periodo de tiempo sustancial antes del tratamiento, tal como durante 8-12 horas. Después de esta abstinencia, el paciente se podrá cateterizar. Se instilarán directamente en la vejiga aproximadamente 50-150 ml de una solución que tiene una concentración de fenilacetato sódico aproximadamente 2,0-200,0 mM, preferiblemente 2-20 mM o fenilbutirato sódico 1,0-100 mM, preferiblemente 1-10 mM u otra cantidad equipotente de un análogo de PA. Después se le pedirá al paciente que retenga el fluido instilado durante todo el tiempo que sea posible. Este tratamiento se repetirá, tal como una vez al día durante dos-cuatro semanas seguido de dos semanas de descanso sin fármaco. Los ciclos como este se pueden repetir tal como hasta 6 meses. De forma similar también se podrán tratar los cánceres de riñón.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un derivado de ácido fenilacético de la fórmula:



en la que

R_0 = arilo, fenoxi, arilo sustituido o fenoxi sustituido;

R_1 y R_2 = H, metoxi, etoxi, metilo, etilo, propilo, butilo de cadena recta y ramificada o halógeno;

R_3 y R_4 = H, metoxi, etoxi, metilo, etilo, propilo, butilo de cadena recta y ramificada o halógeno; y

n = un número entero de 0 a 2;

sales del mismo; estereoisómeros del mismo; y mezclas del mismo,

para la fabricación de un medicamento para sensibilizar un sujeto para terapia con radiación.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que el derivado de ácido fenilacético es fenilacetato sódico.

3. El uso de la reivindicación 1, en el que el derivado de ácido fenilacético es fenilbutirato sódico.

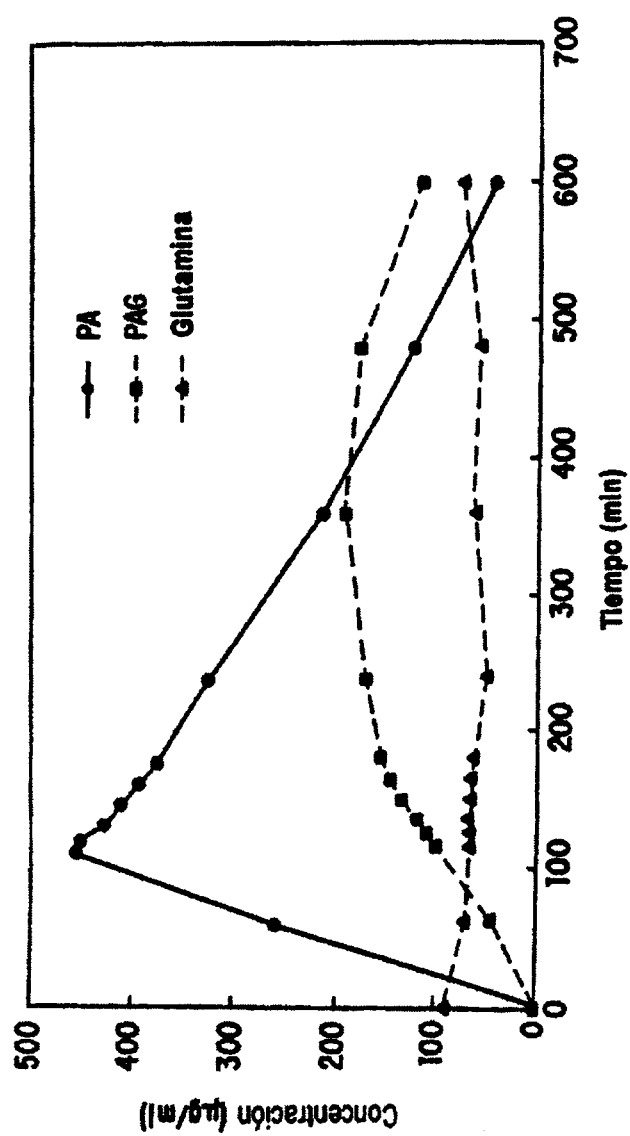


FIG. 1

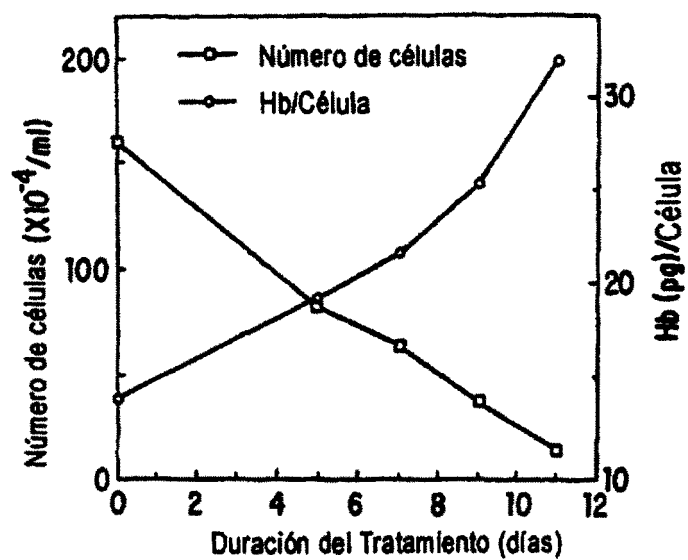


FIG. 2A

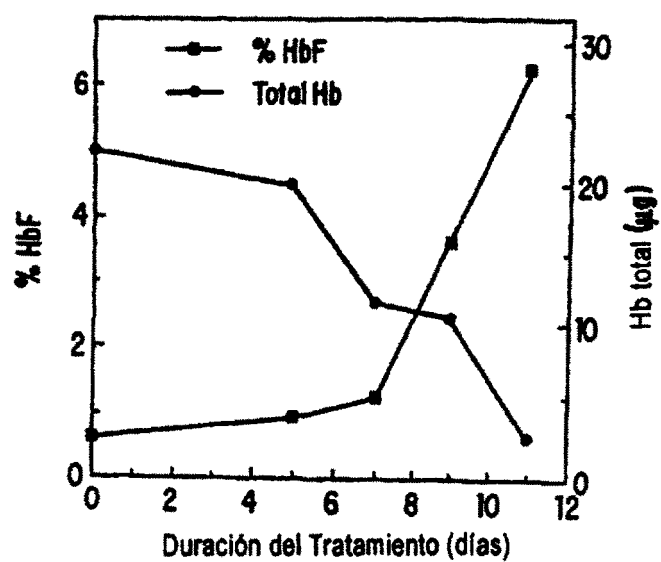


FIG. 2B

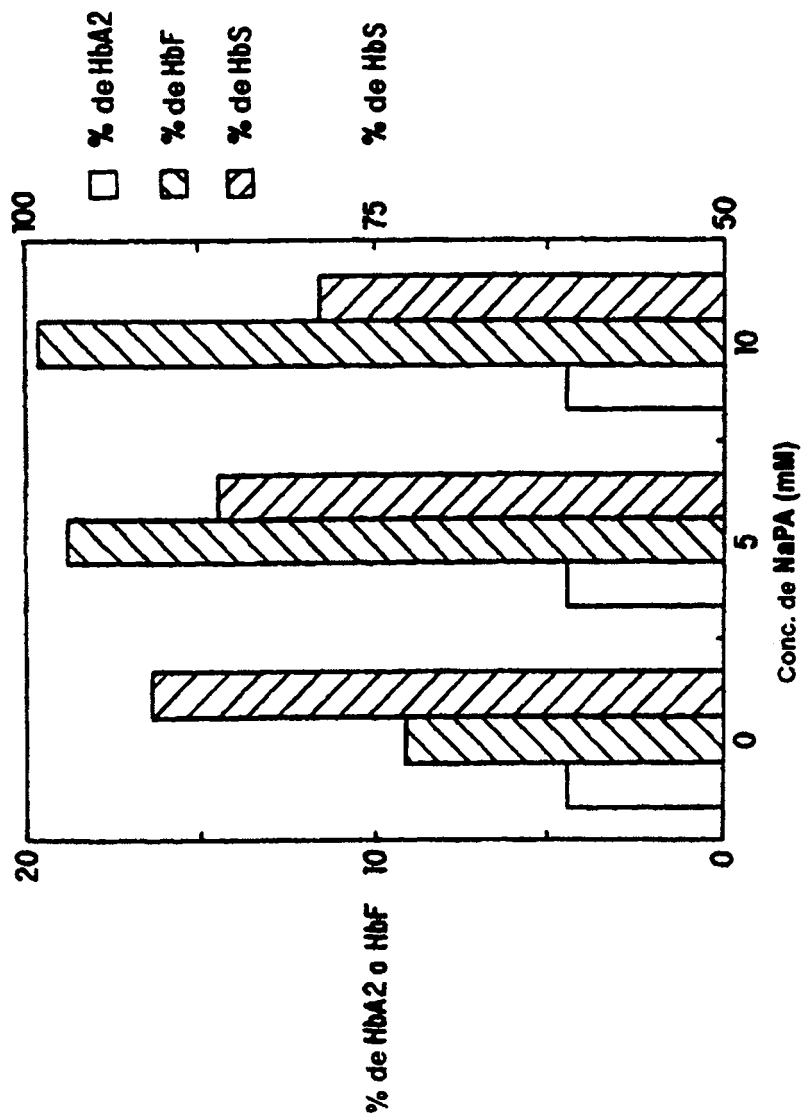


FIG. 3

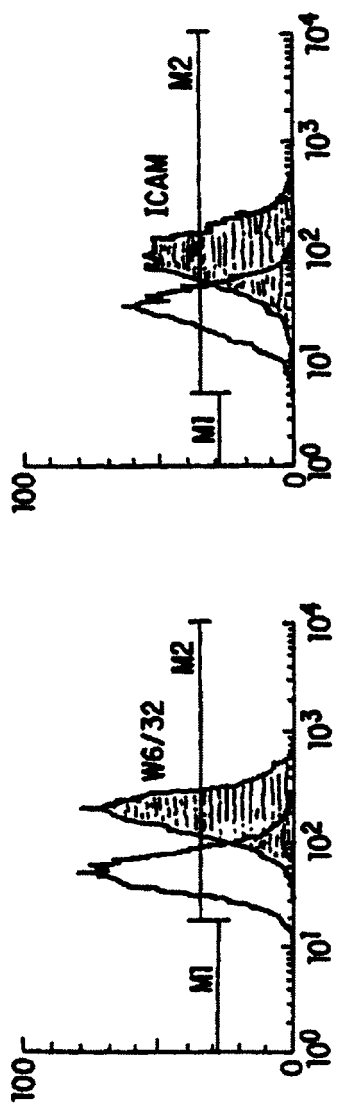


FIG. 4A

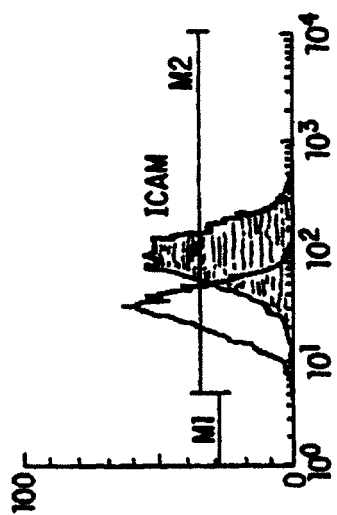


FIG. 4B

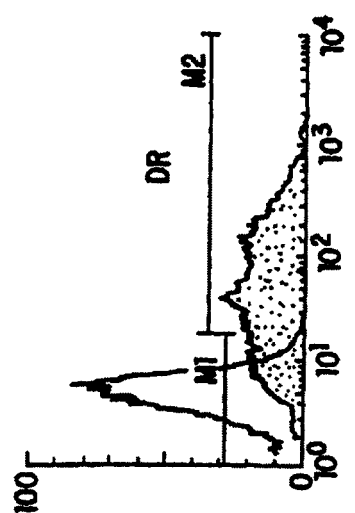


FIG. 4C

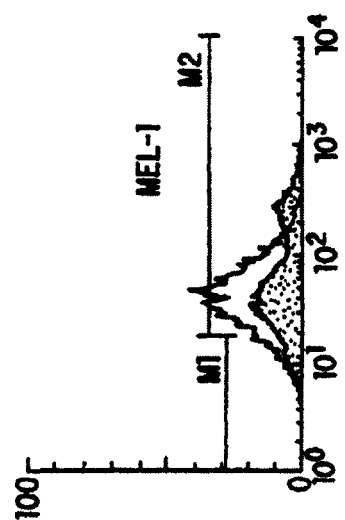


FIG. 4D

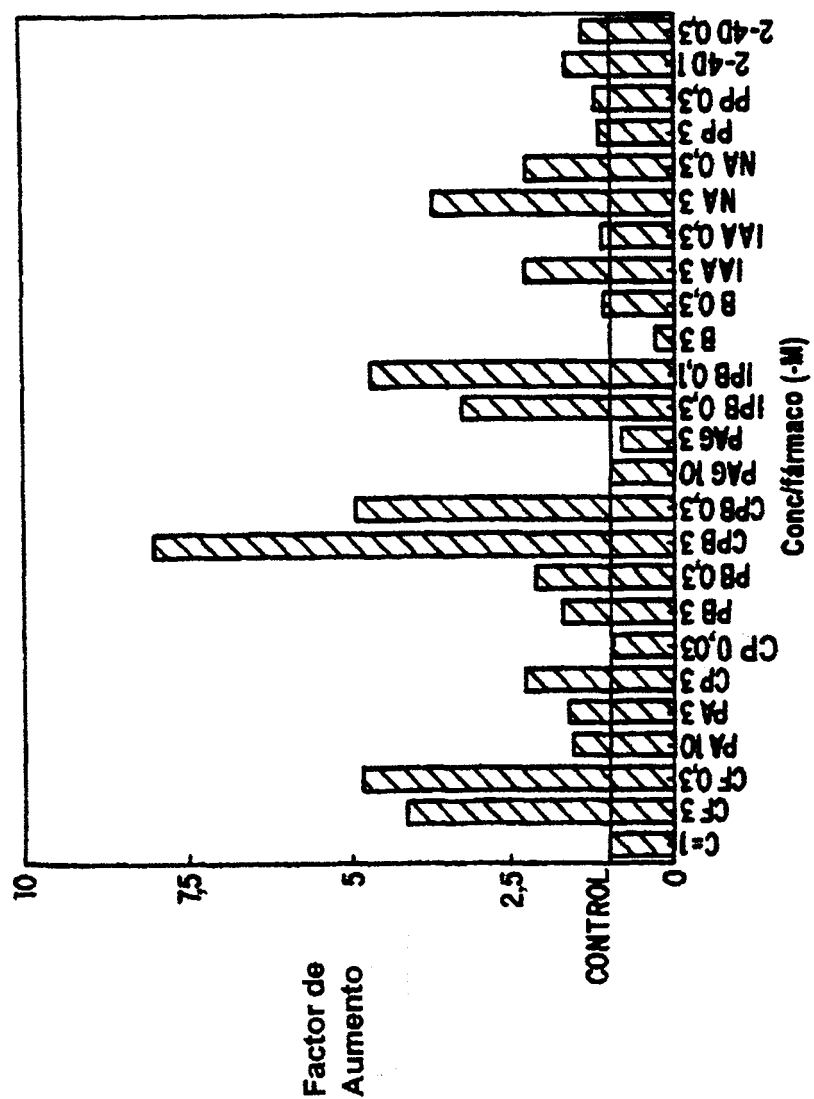


FIG. 5

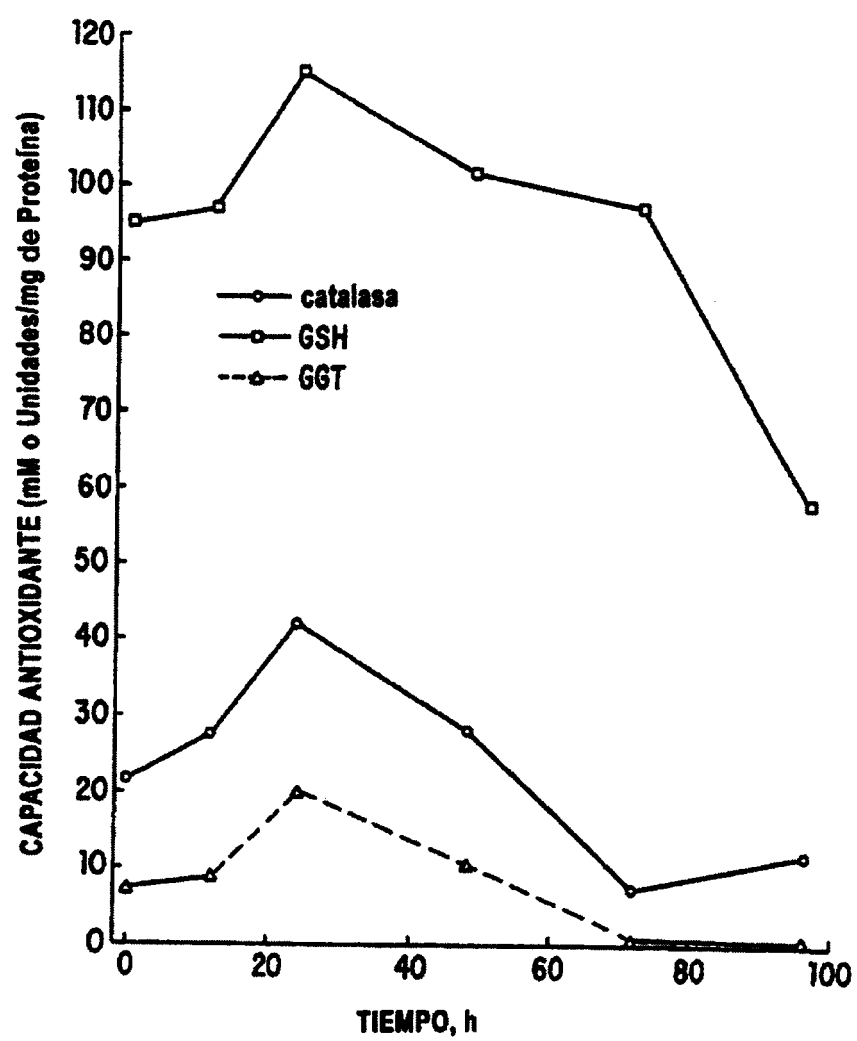


FIG. 6

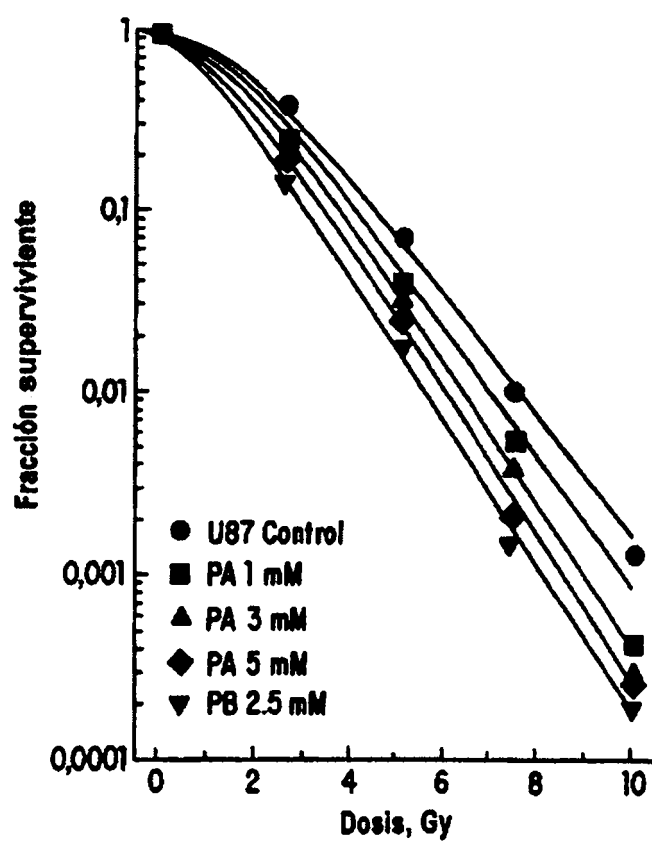


FIG. 7

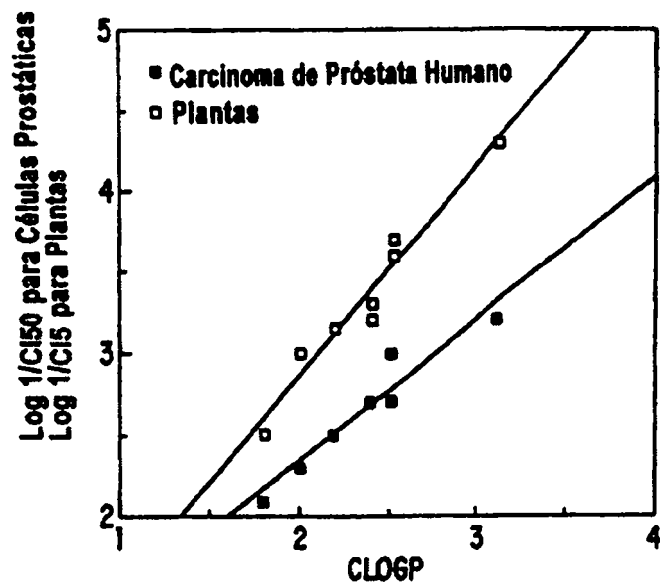


FIG. 8

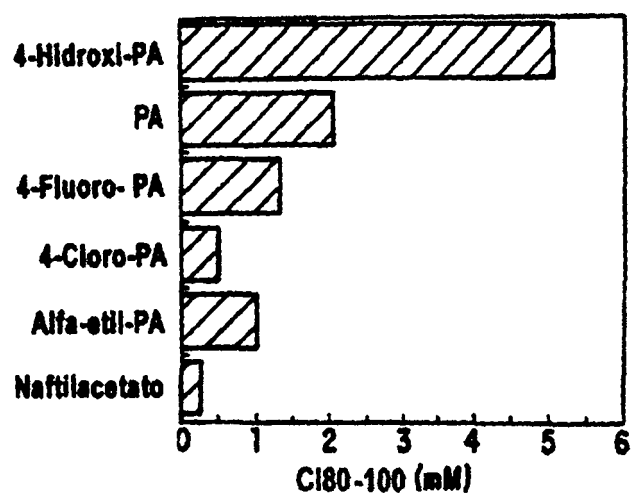


FIG. 9A

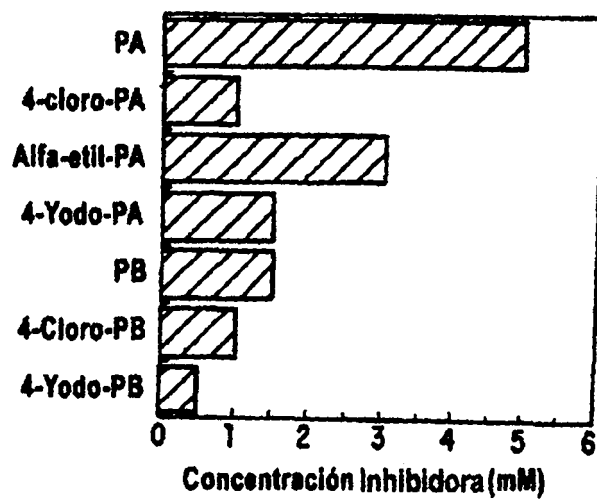


FIG. 9B

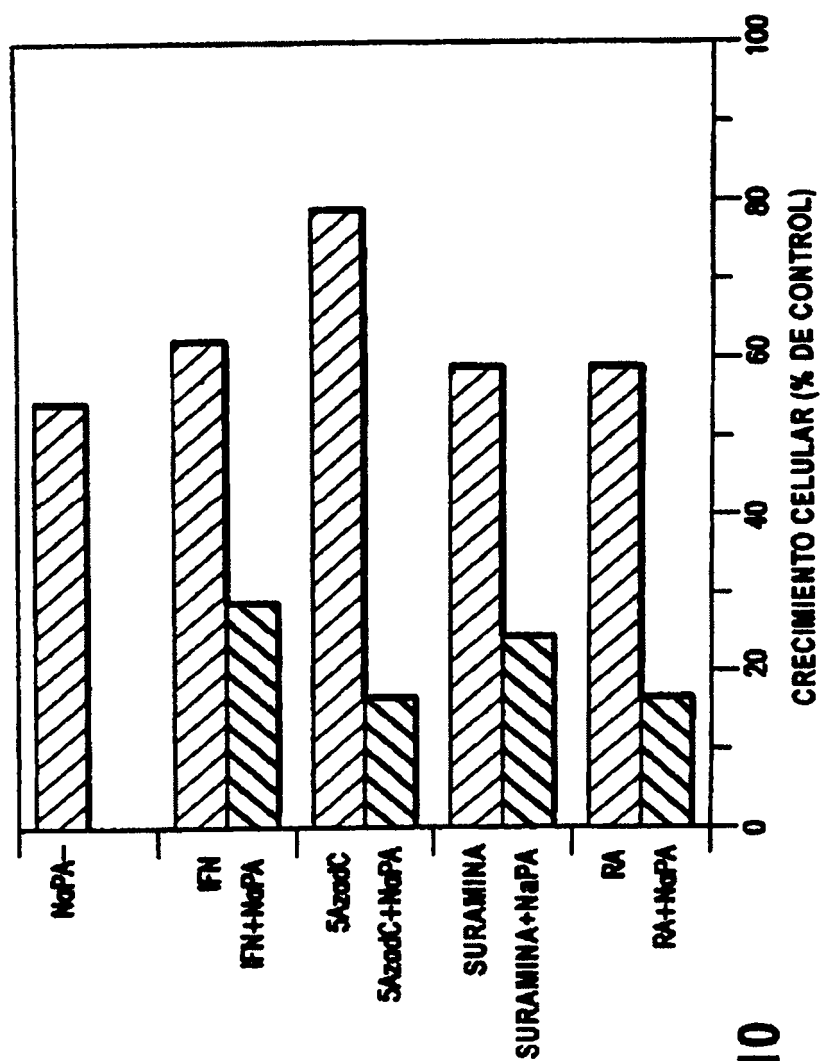


FIG. 10