



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 314 451**

⑤1 Int. Cl.:
A61K 31/353 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **04785845 .1**
⑨6 Fecha de presentación : **27.02.2004**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1596857**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

⑤4 Título: **PMCol para el tratamiento de cáncer de próstata.**

③0 Prioridad: **27.02.2003 US 450510 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

⑦3 Titular/es:
WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
614 North Walnut Street
Madison, Wisconsin 53705, US

⑦2 Inventor/es: **Thompson, Todd A. y**
Wilding, George

⑦4 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

PMCol para el tratamiento de cáncer de próstata.

5 Esta invención se refiere a anti-andrógenos derivados de cromano para prevenir y/o aliviar el cáncer de próstata.

Antecedentes de la invención

10 Las hormonas sexuales masculinas se denominan, como un grupo, andrógenos. Entre los andrógenos, la testosterona juega un papel central en el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales masculinas secundarias, que incluyen: (1) aumento de los órganos sexuales masculinos, la glándula prostática, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales; (2) crecimiento incrementado del pelo corporal, particularmente en la cara y en el pecho, pero acompañado algunas veces de un disminución del crecimiento del pelo en el cuero cabelludo; (3) aumento de la laringe y engrosamiento de las cuerdas bucales; (4) engrosamiento de la piel; (5) crecimiento muscular incrementado; 15 y (6) engrosamiento y fortalecimiento de los huesos.

La testosterona es producida y se secretada, normalmente, por las células intersticiales de los testículos bajo la influencia de la hormona luteinizante (LH). La LH es una gonadotropina secretada por el lóbulo anterior de la glándula pituitaria en respuesta a otro factor secretado por el hipotálamo, denominado factor de liberación de la hormona luteinizante (LH-RF). El grado en el que se desarrollan las características secundarias masculinas está directamente relacionado con la cantidad de testosterona secretada por las células intersticiales de los testículos. Esta cantidad global de testosterona se regula mediante un sistema de retro-alimentación negativa que implica al hipotálamo. A medida que la concentración de testosterona en sangre aumenta, el hipotálamo detecta la testosterona mediante los receptores de andrógenos y se inhibe y, consecuentemente, su estimulación de la glándula pituitaria anterior mediante 25 LH-RF decrece. A medida que la secreción de LH por la pituitaria se reduce, la cantidad de testosterona liberada por las células intersticiales de los testículos se reduce también. Sin embargo, a medida que el nivel de testosterona en sangre disminuye, se inhibe menos el hipotálamo y, de nuevo, estimula a la glándula pituitaria para que libere LH. El aumento de la secreción de LH provoca que las células intersticiales liberen más testosterona, y su nivel en sangre aumente.

30 Como se puede apreciar de la variedad de características sexuales masculinas secundarias, el cuerpo posee una plétora de tejidos y órganos que responden a las hormonas sexuales. Desafortunadamente, muchos tipos de cánceres presentan susceptibilidad a los mecanismos de control de las hormonas sexuales que regulan el crecimiento del órgano o tejido a partir del cual surge el neoplasma. Por el lado positivo, los cánceres que se originan en los órganos endocrinos y en el sistema inmune son especialmente susceptibles a las terapias médicas basadas en hormonas sexuales, en antagonistas de hormonas sexuales y/o en privación hormonal. De hecho, las hormonas sexuales y sus antagonistas representan agentes útiles para el tratamiento de cánceres comunes que surgen a partir de las mamas, glándula prostática y útero.

40 Respecto a esto, el papel de la cirugía tradicional en la eliminación endocrina ha disminuido ya que se han identificado agentes químicos que pueden reemplazar a los procedimientos quirúrgicos. Por ejemplo, la castración quirúrgica, también denominada orquiectomía, útil para retrasar o evitar la progresión del cáncer de próstata mediado por andrógenos, se podría llevar a cabo "de forma química" mediante la administración de un anti-andrógeno en combinación con un agonista de LH-RF conocido. La combinación anti-andrógeno/ LH-RF disminuye de forma efectiva el nivel de testosterona que, si se deja sin control, aumenta la velocidad de crecimiento de las neoplasias prostáticas dependientes de testosterona. Los agonistas de LH-RF representativos incluyen leuprolida o goserelina, descritos en las Patentes de EE.UU. n° 4.897.256 y 5.510.460, respectivamente. Los anti-andrógenos útiles incluyen flutamida, bicalutamida o nilutamida. La flutamida es un antagonista no esteroideo del receptor de andrógenos, distribuido bajo el nombre comercial de Eulexin, como se describe en la Patentes de EE.UU. n° 3.995.060 y 4.474.813. La bicalutamida en un antagonista no esteroideo del receptor de andrógenos, distribuido bajo el nombre comercial de Casodex, como se describe en la Patente de EE.UU. n° 4.636.505. La nilutamida es también un antagonista no esteroideo del receptor de andrógenos, distribuido bajo el nombre comercial de Nilandron, como se describe en la Patente de EE.UU. n° 5.023.088.

55 Desafortunadamente, las terapias hormonales para el cáncer de próstata, aunque ofrecen a muchos pacientes una opción no invasiva a los drásticos procedimientos quirúrgicos, normalmente, están acompañadas por muchas complicaciones o efectos secundarios. Los agonistas de LH-RF, que incluyen leuprolida y goserelina, actúan disminuyendo la testosterona hasta niveles de post-castración pero estos agonistas resultan también en impotencia y en sofocos. Asimismo, los anti-andrógenos dirigidos al receptor de andrógenos, que incluyen flutamida y bicalutamida, a menudo provocan diarrea, aumento del pecho (también conocido como ginecomastia), pérdida de libido y náuseas (Soloway, M.S. *et al.*, Urología 47 (Suppl 1A): 33-37, 1996). También ha habido descripciones de casos con efectos tóxicos en el hígado (Wysowski, D.D., *et al.*, Annals of Internal Medicine 118(11): 860-864, 1993).

65 En parte, los efectos secundarios observados en las terapias químicas actuales son debidos a las características no deseables de los compuestos anti-andrógenos actuales que permiten cruzar la barrera hemato-encefálica y afectar a los receptores de andrógenos del sistema nervioso central, además de a los de tejidos periféricos. Mientras que los receptores de andrógenos en el hipotálamo y en los tejidos periféricos han sido bien estudiados, se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares reales que dan como resultado las complicaciones, que incluyen, pero no se limitan a,

pérdida de libido y náuseas. Así, la penetración de la barrera hemato-encefálica por los agentes actuales no es deseable y son extremadamente deseables agentes mejorados dirigidos principalmente a los tejidos periféricos.

Otro efecto no deseable de algunos de los agentes anti-andrógenos actuales es su capacidad, no deseable, de ejercer una actividad agonista parcial en algunas células de cáncer de próstata. Por ejemplo, se ha mostrado que el anti-andrógeno flutamida estimula, en lugar de inhibir, el crecimiento de las células del carcinoma de próstata humano LNCaP, en condiciones de laboratorio (The Prostate 14: 103-115 (1989)). Esto podría estimular potencialmente, en lugar de inhibir, el crecimiento de los cánceres de próstata en un grupo de pacientes. Por lo tanto, los anti-andrógenos más favorables deberían presentar actividad antagonista pura respecto del receptor de andrógenos, independientemente de su contexto biológico (esto es, nunca actúan como agonistas del receptor de andrógenos).

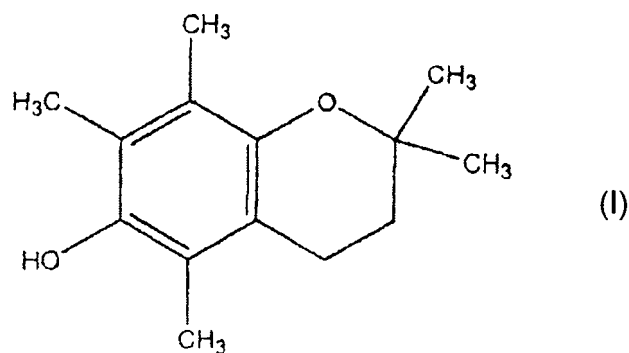
Mientras que los compuestos anti-andrógenos se pueden usar en terapias de cáncer, estos compuestos tienen también utilidad en las terapias hormonales no relacionadas con cáncer. Por ejemplo, el hirsutismo dependiente de andrógenos, se manifiesta por un exceso de pelo en las mujeres, se trata actualmente con el anti-andrógeno flutamida. Desafortunadamente, las mujeres tratadas con flutamida han experimentado muchos de los mismos efectos secundarios descritos anteriormente, debido a la naturaleza general de la actividad antagonista de la flutamida.

Como se puede apreciar fácilmente, la calidad de vida que permiten las terapias hormonales actuales, en particular las terapias que utilizan anti-andrógenos, es muy inferior a la deseable. Por lo tanto, existe una necesidad de anti-andrógenos que ofrezcan a los pacientes complicaciones reducidas, a la vez que proporcionan unos regímenes efectivos de terapia hormonal. Los anti-andrógenos dirigidos de forma específica a los tejidos periféricos serían extremadamente valiosos para mejorar la calidad de la terapia hormonal disponible para aquellos que la necesiten.

Resumen de la invención

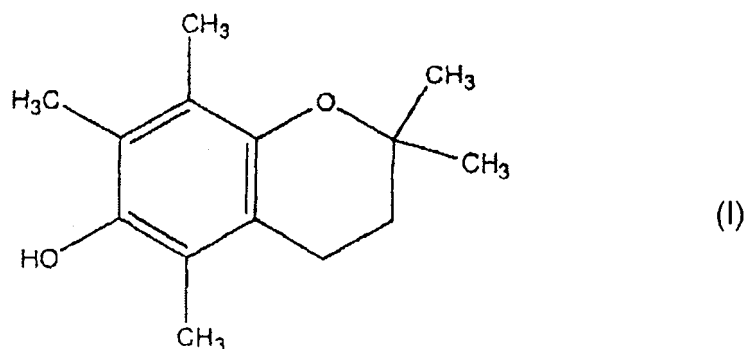
La presente invención se basa en el descubrimiento pionero del inventor de que el resto derivado del cromanol de la vitamina E posee una potente actividad anti-androgénica en células dependientes de andrógenos. En particular, el compuesto 2,2,5,7,8-pentametil-6-cromanol (PMCoI) fue identificado por los inventores por demostrar una actividad antagonista pura hacia el receptor de andrógenos en líneas celulares de carcinoma de próstata. La actividad anti-andrógeno de los compuestos derivados de cromanol era desconocida con anterioridad. Las distintas formas de realización de la invención descritas y reivindicadas en esta memoria proporcionan, de este modo, procedimientos y composiciones ventajosos que se basan en los inesperados descubrimientos de los inventores.

En esta memoria se revela el uso de un compuesto que tiene la fórmula



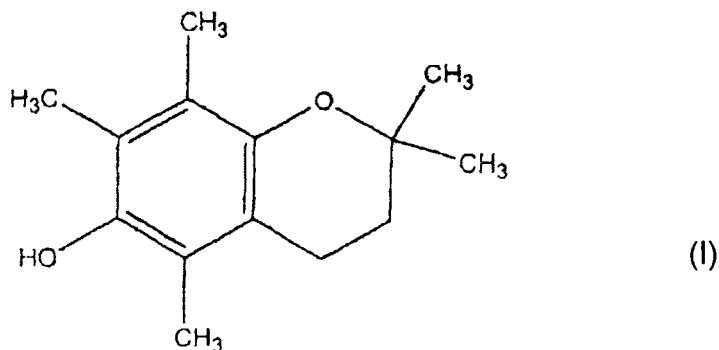
o una sal de dicho compuesto farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un alimento funcional para retrasar la progresión del cáncer de próstata en un paciente que sufre de cáncer de próstata, o para prevenir la ocurrencia o recurrencia del cáncer de próstata en un paciente que tiene riesgo de padecerlo.

También se revela el uso de un compuesto de fórmula (I)



o una sal de dicho compuesto farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un alimento funcional para retrasar la progresión del cáncer de próstata en un paciente que sufre de cáncer de próstata, o para prevenir la ocurrencia o recurrencia de cáncer de próstata en un paciente que tiene riesgo de padecerlo.

Se revela adicionalmente una composición de alimento funcional, para retrasar la progresión del cáncer de próstata en un paciente que sufre de cáncer de próstata, o para prevenir la ocurrencia o recurrencia del cáncer de próstata en un paciente que tiene riesgo de padecerlo, que comprende un artículo alimenticio o parte de un artículo alimenticio y un compuesto que tiene la fórmula:



o una sal de dicho compuesto farmacéuticamente aceptable; y un portador aceptable, así como composiciones de alimento funcional que comprenden, adicionalmente, un agente que potencia el sistema inmune, un agente anti-inflamatorio, un agente anti-oxidante o una mezcla de ellos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Estructura de la vitamina E (esto es, α -tocoferol) y compuestos relacionados. A, α -tocoferol. B, 2,2,5,7,8-pentametil-6-cromanol (PMCol). C, 2,2,5,7,8-pentametilcromano (PMC).

Figura 2. Análisis de competición de PMCol de la unión de R1881 en células de carcinoma de próstata humana. A, se determinó una curva dosis-respuesta para la competición de PMCol, PMC y bicalutamida por la unión al receptor de andrógenos de ^3H -R1881, en células LNCaP. B, la competición por la unión de ^3H -R1881 en células LAPC4 se determinó para 30 μM PMCol y 1 μM bicalutamida (* $P < 0,05$; n = 4).

Figura 3. Modulación del crecimiento de células de carcinoma de próstata humano por PMCol. A, curva dosis-respuesta de células DU145, LAPC4 y LNCaP, crecidas en medio que contenía un 5% de suero, medida 4 días después del tratamiento con PMCol. El tratamiento con 50 μM de PMCol reduce de forma significativa el crecimiento de las células de próstata LNCaP, mientras que se requirió una concentración de 80 μM de PMCol para disminuir significativamente el crecimiento de la línea celular de próstata DU145, independiente de andrógenos (* $P < 0,05$). B, la curva dosis-respuesta a PMCol del crecimiento de células LNCaP, se determinó en células expuestas a condiciones deficientes de andrógenos (esto es, usando un medio que contenía niveles de andrógenos reducidos) con o sin la adición de una dosis estimuladora del crecimiento de 0,05 nM de R1881 o una dosis inhibidora del crecimiento de 1,0 nM de R1881 (* significativamente diferente de células tratadas con 0 μM PMCol; $P < 0,05$; n = 6).

Figura 4. Se determinaron los cambios en la respuesta de crecimiento bifásico de LNCaP estimulada por R1881, después del tratamiento con 30 μM de PMCol, 30 μM de PMC o 1 μM de bicalutamida durante 4 días. La inhibición de la respuesta de crecimiento se aprecia fácilmente con una exposición a 0,3 nM de R1881, a la que el crecimiento de LNCaP con un tratamiento con PMCol, PMC y bicalutamida fue equivalente a la respuesta de crecimiento en células control, producida por exposición a 0,03 nM de R1881 únicamente.

Figura 5. Análisis de los efectos de PMCol sobre la secreción de PSA inducida por andrógenos de células LNCaP. La secreción de PSA se determinó 48 horas después de la exposición a una dosis estimuladora del crecimiento de 0,05 nM de R1881 o a una dosis inhibidora del crecimiento de 1,0 nM de R1881, en presencia de 30 μM PMC, 30 μM PMCol o 1 μM bicalutamida. (* $P < 0,05$ en comparación con células tratadas con 0,05 nM R1881; ** $P < 0,05$ en comparación con células tratadas con 1,0 nM de R1881; n = 3).

Figura 6. Actividad del promotor MMTV inducida por andrógenos en células LNCaP (A) y LAPC4 (B) después del tratamiento con PMCol. A, los efectos de los tratamientos con 25 μM PMCol, 50 μM PMCol y 1 μM bicalutamida durante 24 h sobre la actividad del promotor MMTV inducida por R1881, se ensayó en células LNCaP. B, las células LAPC4 expuestas a 30 μM PMCol inhibían de forma efectiva la actividad del promotor MMTV inducida por andrógenos (* $P < 0,05$; n = 4).

Figura 7. Análisis por inmunoblot del nivel de proteína RA. Los niveles de proteína RA no se alteraron significativamente en células LNCaP expuestas a 30 μM PMC, 30 μM PMCol o 1 μM bicalutamida, durante 5 días, en

comparación con los niveles de RA en las células expuestas al vehículo, como control. Las células LNCaP se crecieron en medio que contenía 5% de suero para proporcionar andrógenos de suero endógenos, permitiendo así la modulación anti-androgénica de los niveles de proteína RA. La flecha grande señala las bandas de la proteína RA y la flecha pequeña señala las bandas de la proteína β -actina.

Figura 8. Datos de toxicidad oral aguda en ratones. A, esta gráfica muestra que no hay cambios significativos en la masa corporal del animal después de la administración de una única dosis alta de PMCol, en comparación con el control de vehículo, 48 horas después de la administración de PMCol. B, no se observaron diferencias significativas en el cambio de masa corporal, en comparación con ratones tratados diariamente con PMCol o vehículo a lo largo de 10 días. C, no se observaron grandes cambios en los órganos ni en ratones tratados con PMCol ni en ratones control, como se ejemplifica por los datos en el peso del hígado, que no varió significativamente en ratones que recibieron PMCol diariamente a lo largo de 10 días.

Descripción detallada de la invención

I. En general

Se debe apreciar que, como se usa en esta memoria y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular “un”, “uno/a” y “el” incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una pluralidad de esas células y de células equivalentes a ellas, conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Asimismo, el término “un” (o “uno/a”), “uno/a o más” y “al menos uno/a” se pueden usar de forma intercambiable en esta memoria. También se debe apreciar que los términos “que comprende”, “que incluye” y “que tiene” se pueden usar de forma intercambiable.

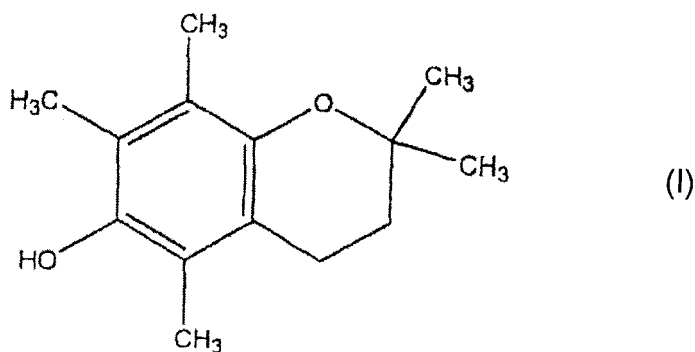
A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por cualquier experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en esta memoria se pueden usar en la práctica o en el ensayo de la presente invención, los procedimientos y materiales preferidos se describen ahora.

Las abreviaturas usadas en esta memoria incluyen; RA, receptor de andrógenos; α CEHC, α -carboxietilhidroxicromano; CSS, suero tratado con carbón activado; DMEM, medio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium); BSF, suero bovino fetal; MMTV/LTR, repeticiones terminales largas del virus del tumor mamario de ratón; PBS, solución salina tamponada con fosfato; PMC, 2,2,5,7,8-pentametilcromano; PMCol, 2,2,5,7,8-pentametil-6-cromanol; PSA, antígeno específico de próstata; R1881, metiltrienolona.

II. La invención

La presente invención proporciona usos médicos de 2,2,5,7,8-pentametil-6-cromanol (PMCol). Debido a la estructura química del PMCol, éste presenta una solubilidad significativa en agua. Estos compuestos son particularmente deseables como anti-andrógenos mejorados, debido a que no atravesarán fácilmente la barrera hemato-encefálica en cantidades suficientemente significativas para provocar cambios en los parámetros fisiológicos, afectados por los receptores de andrógenos de los tejidos del cerebro que residen detrás de la barrera hemato-encefálica. De acuerdo con esto, los presentes efectos terapéuticos se alcanzan por antagonismo con los receptores de andrógenos, en sustancialmente, sólo los tejidos y órganos periféricos, contrastando con los antagonistas de los receptores de andrógenos anteriores. Además, el compuesto anti-andrógeno usado según la invención es un antagonista puro y no presenta siquiera una actividad agonista parcial, como se analizó en, por ejemplo, las células de carcinoma de próstata humano LNCaP.

La presente invención proporciona el uso de un compuesto que tiene fórmula:



o una sal de dicho compuesto farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para retrasar la progresión del cáncer de próstata en un paciente que sufre de cáncer de próstata, o para prevenir la ocurrencia o

recurrencia del cáncer de próstata en un paciente que tiene riesgo de padecerlo, así como su uso para la fabricación de un alimento funcional para retrasar la progresión del cáncer de próstata en un paciente que sufre de cáncer de próstata, o para prevenir la ocurrencia o recurrencia del cáncer de próstata en un paciente que tiene riesgo de padecerlo.

La invención proporciona, además, una composición de alimento funcional para retrasar la progresión del cáncer de próstata en un paciente que sufre de cáncer de próstata, o para prevenir la ocurrencia o recurrencia del cáncer de próstata en un paciente que tiene riesgo de padecerlo, que comprende un artículo alimenticio o parte de un artículo alimenticio y un compuesto de fórmula (I), o una sal de dicho compuesto farmacéuticamente aceptable, y un portador aceptable.

Se proporcionan también composiciones para alimentos funcionales, en las que la composición comprende adicionalmente un agente para potenciar el sistema inmune, un agente anti-inflamatorio, un agente anti-oxidante, o una mezcla de los mismos.

Como se usa en esta memoria, los receptores para las moléculas de señalización extracelular se denominan “receptores” colectivamente. Muchos receptores son proteínas transmembrana expresadas en una superficie celular, en la que contactan o se unen a una molécula de señalización extracelular (esto es, un ligando). De esta forma, los receptores inician una cascada de señales intracelulares que altera el comportamiento de la célula. Contrastando con esto, en algunos casos, los receptores están localizados en el interior de la célula y el ligando de señalización debe entrar primero en la célula, mediante transporte pasivo o activo, para activar al receptor.

Las hormonas esteroides son un ejemplo de moléculas pequeñas que difunden directamente a través de la membrana plasmática de las células diana y se unen a receptores intracelulares. Estos receptores están estructuralmente relacionados y constituyen la superfamilia de receptores intracelulares (o superfamilia de receptores de hormonas esteroides). Los receptores de hormonas esteroides incluyen los receptores de progesterona, los receptores de estrógenos, los receptores de glucocorticoides y los receptores de mineralocorticoides.

Los ensayos para medir la actividad anti-andrógena de los compuestos derivados de cromano, como se describen en esta memoria, son muy conocidos por cualquier experto en la técnica. Por ejemplo, la actividad antagonista del receptor de andrógenos se puede determinar monitorizando la capacidad de un compuesto anti-andrógeno candidato para inhibir el crecimiento de un tejido dependiente de andrógenos, proporcionándose un ejemplo de este tipo de ensayo en la sección de Ejemplos siguiente.

Como se define en esta memoria, el término “que entra en contacto” significa que el compuesto anti-andrógeno usado en la presente invención se introduce en el interior de una muestra que contiene al receptor, en un tubo de ensayo, un matraz, un cultivo de tejidos, un chip, una serie, una placa, una microplaca, un capilar, o similar, y se incubaba a una temperatura y durante un tiempo suficientes para permitir la unión del compuesto antiandrógeno al receptor. Los procedimientos para que las muestras entren en contacto con el compuesto anti-andrógeno u otro componente específico de la unión son conocidos por los expertos en la técnica y se podrían seleccionar dependiendo del tipo de protocolo de ensayo que se vaya a realizar. Los procedimientos de incubación son también estándar y son conocidos por los expertos en la técnica.

En otra forma de realización, el término “que entra en contacto” significa que el compuesto anti-andrógeno usado en la presente invención se introduce en un paciente que recibe tratamiento y se permite que el compuesto entre en contacto con el receptor de andrógenos *in vivo*.

Como se usa en esta memoria, el término “que se trata” incluye un tratamiento de prevención así como un tratamiento para la remisión del trastorno. Como se usa en esta memoria, los términos “que reduce”, “que suprime” y “que inhibe” tienen el significado entendido comúnmente de disminución o decrecimiento. Como se usa en esta memoria, el término “progresión” significa que aumenta su alcance o gravedad, avance, crecimiento o se hace peor. Como se usa en esta memoria, el término “recurrencia” significa la vuelta de una enfermedad después de su remisión.

Como se usa en esta memoria, el término “que se administra” se refiere a poner en contacto a un paciente, tejido, órgano o células con un compuesto anti-andrógeno según la Fórmula I. Como se usa en esta memoria, la administración se puede llevar a cabo *in vitro*, esto es, en un tubo de ensayo, o *in vivo*, esto es, en células o tejidos de organismos vivos, por ejemplo, seres humanos. Un “paciente” o “individuo”, usados de forma equivalente en esta memoria, se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, que: (1) tiene cáncer de próstata que se puede tratar mediante la administración de un compuesto anti-andrógeno según la Fórmula I; o (2) es susceptible al cáncer de próstata, que se puede prevenir mediante la administración de un compuesto anti-andrógeno según la Fórmula I.

En esta memoria se revelan composiciones que comprende el compuesto I como el único ingrediente activo para el tratamiento del cáncer de próstata, para el retraso de la progresión del cáncer de próstata, para la prevención del inicio del cáncer de próstata y para la prevención y/o tratamiento de la recurrencia del cáncer de próstata, que podría comprender adicionalmente uno o más agentes terapéuticos según la reivindicación 4.

Como se usa en esta memoria, el término “composición farmacéutica” significa una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto anti-andrógeno junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes y adyuvantes, denominados colectivamente “portadores farmacéuticamente aceptables”. Como se usa en esta memoria, los términos

“cantidad efectiva” y “cantidad terapéuticamente efectiva” se refieren a la cantidad de agente terapéutico activo que es suficiente para generar una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos, tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica. La “cantidad efectiva” específica variará, obviamente, con factores tales como la afección particular que se está tratando, la condición física del paciente, el tipo de animal que se está tratando, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si hay alguna) y las formulaciones específicas utilizadas y la estructura de los compuestos o sus derivados. En este caso, una cantidad se podría considerar terapéuticamente efectiva si resulta en uno o más de los efectos siguientes: (a) la prevención de un trastorno mediado por andrógenos (por ejemplo, cáncer de próstata); y (b) la reversión o estabilización de un trastorno mediado por andrógenos (por ejemplo, cáncer de próstata). Las cantidades efectivas óptimas pueden ser determinadas fácilmente por cualquier experto en la técnica utilizando experimentación de rutina.

Las composiciones farmacéuticas son formulaciones líquidas o liofilizadas o secadas de otra forma e incluyen diluyentes que contienen distintos tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción a superficies, detergentes (por ejemplo, Tween® 20, Tween® 80, Pluronic® F68, sales de ácidos biliares), agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol), anti-oxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (por ejemplo, Timerosal, alcohol bencílico, parabenos), sustancias no digeribles o modificadores de la tonicidad (por ejemplo, lactosa, manitol), unión covalente de polímeros tales como polietilenglicol a las proteínas, acomplejamiento con iones metálicos, o incorporación del material en o sobre preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas eritrocitarios o esferoplastos. Estas composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo*, y la velocidad de eliminación *in vivo*. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen formulaciones en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites).

Las composiciones podrían incorporar revestimientos protectores de formas en partículas, inhibidores de proteasas o potenciadores de la permeabilidad para distintas vías de administración que incluyen, parenteral, pulmonar, nasal y oral. La composición farmacéutica se podría administrar de forma parenteral, paracancerosa, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal e intratumoral.

Además, como se usa en esta memoria, el término “portadores farmacéuticamente aceptables” es muy conocido para los expertos en la técnica e incluye, pero no se limita a, 0,01-0,1 M y, preferentemente, 0,05 M de tampón fosfato o 0,9% de solución salina. Adicionalmente, tales portadores farmacéuticamente aceptables podrían ser disoluciones acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina o medio tamponado.

Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, solución de Ringer con dextrosa, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer lactado y aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reconstituyentes de fluidos y nutrientes, reconstituyentes de electrolitos tales como los que se basan en solución de Ringer con dextrosa, y similares. También podrían estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, anti-microbianos, anti-oxidantes, agentes de agregación, gases inertes y similares.

Las composiciones de liberación controlada o sostenida, que se pueden administrar según la invención, incluyen las formulaciones en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). También están abarcados por la invención las composiciones en partículas revestidas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado a anticuerpos dirigidos frente a receptores específicos de tejido, ligandos o antígenos o acoplados a ligandos de receptores específicos de tejidos.

Las composiciones administradas podrían incorporar formas en partículas, revestimientos protectores, inhibidores de proteasas o potenciadores de la permeabilidad para distintas vías de administración, que incluyen la parenteral, pulmonar, nasal u oral.

La composición farmacéutica se puede administrar en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el agente se podría administrar usando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otras formas de administración. Se podría usar una bomba (véanse Langer, *supra*; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987); Buchwald *et al.*, Surgery 88: 507 (1980); Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989). Alternativamente, se pueden usar materiales poliméricos. Un sistema de liberación controlada se puede colocar próximo a la diana terapéutica, esto es, la próstata, requiriéndose de esta forma sólo una fracción de la dosis sistémica (véanse, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (Science 249: 1527-1533 (1990).

La preparación farmacéutica puede comprender un compuesto I solo, o puede incluir adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, y puede estar en formas sólidas o líquidas, tales como comprimidos, polvos, cápsulas, pastillas, disoluciones, suspensiones, elixires, emulsiones, geles, cremas o supositorios, que incluyen supositorios rectales y uretrales. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen gomas, almidones, azúcares, materiales celulósicos y mezclas de los mismos. La preparación farmacéutica que contiene un compuesto anti-andrógeno se puede administrar a un paciente mediante, por ejemplo, implantación subcutánea de una pastilla. En una forma de realización

adicional, la pastilla proporciona la liberación controlada del compuesto anti-andrógeno a lo largo de un periodo de tiempo. La preparación se puede administrar, también, mediante inyección intravenosa, intraarterial o intramuscular de una preparación líquida, mediante administración oral de una preparación líquida o sólida, o mediante aplicación tópica. La administración se puede llevar a cabo también mediante el uso de un supositorio rectal o de un supositorio uretral.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden administrar por la invención se pueden preparar mediante procedimientos conocidos de disolución, mezclado, granulación o formación de comprimidos. Para la administración oral, los compuestos anti-andrógenos o sus derivados tolerados fisiológicamente, tales como sales, ésteres, N-óxidos y similares, se mezclan con aditivos habituales para este propósito, tales como vehículos, estabilizadores, o diluyentes inertes, y se convierten, por los procedimientos habituales, en formas de administración adecuadas, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina duras o blandas, disoluciones acuosas, alcohólicas o aceitosas. Los ejemplos de vehículos inertes adecuados son las bases para comprimidos convencionales, tales como lactosa, sacarosa o almidón de maíz, en combinación con aglutinantes tales como acacia, almidón de maíz, gelatina, con agentes de desintegración tales como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, o con un lubricante tal como ácido esteárico o estearato de magnesio.

Son ejemplos de vehículos o disolventes aceitosos adecuados los aceites vegetales o animales, tales como aceite de girasol o aceite de hígado de pescado. Las preparaciones se pueden efectuar como gránulos, tanto secos como húmedos. Para la administración parenteral (inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial o intramuscular), los compuestos anti-andrógenos o sus derivados tolerados fisiológicamente, tales como sales, ésteres, N-óxidos, y similares, se convierten en una disolución, suspensión o expulsión, si se desea con sustancias habituales y adecuadas para este propósito, por ejemplo, solubilizadores u otros auxiliares. Son ejemplos los líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin la adición de un tensioactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Los aceites ilustrativos son aquellos procedentes de petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, los portadores líquidos preferidos, en particular para disoluciones inyectables, son agua, solución salina, dextrosa acuosa y otras disoluciones de azúcar relacionadas, y glicoles tales como propilenglicoles o polietilenglicoles.

Se conoce bien en la técnica la preparación de composiciones farmacéuticas que contienen un componente activo. Tales composiciones se podrían preparar como aerosoles liberados a la nasofaringe o como inyectables, bien como disoluciones líquidas o bien como suspensiones; sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la disolución en, o suspensión en, un líquido, antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar. El ingrediente terapéutico activo se mezcla, frecuentemente, con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol, o cualquier combinación de ellos.

Además, la composición puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento de pH, que aumentan la eficiencia del ingrediente activo.

Un compuesto activo se puede formular en la composición como una forma de sal farmacéuticamente aceptable neutralizada. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, que están formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico y mandélico. Las sales formadas a partir de grupos carboxilo libres también se pueden derivar a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina y procaína.

Para la administración tópica a las superficies corporales usando, por ejemplo, cremas, geles y gotas, el compuesto de fórmula I se prepara y se aplica como disoluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un portador farmacéutico.

El compuesto activo se puede administrar en una vesícula, en particular un liposoma (véanse Langer, Science 249: 1527-1533 (1990), Treat *et al.*, en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds), Liss, N.Y., pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein *ibid.*, pp. 317-327; véase *ibidem* de forma general).

Para su uso en medicina, las sales del compuesto anti-andrógeno son sales farmacéuticamente aceptables.

Además, el compuesto I se podría proporcionar en forma de composiciones de alimentos funcionales, en las que el compuesto previene el inicio de, o reduce, o estabiliza, el cáncer de próstata. El término "alimento funcional" o "composición de alimento funcional", para los propósitos de esta memoria descriptiva, se refiere a un artículo alimenticio, o a una parte de un artículo alimenticio, que ofrece beneficios médicos para la salud, que incluyen la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad. Una composición de alimento funcional según la presente invención podría contener sólo el compuesto de fórmula I, como el ingrediente activo o, alternativamente, podría comprender adicionalmente, en mezcla con el mencionado compuesto I, suplementos de la dieta que incluyen vitaminas, coenzimas, minerales, hierbas y aminoácidos, que suplementan la dieta al incrementar la ingestión total de esa sustancia.

Por lo tanto, la presente invención proporciona alimentos funcionales para proporcionar beneficios a un paciente que comprenden un compuesto que tiene Fórmula I o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. Estas compo-

siciones incluyen, generalmente, un “portador aceptable para un alimento funcional” que, como se hace referencia en esta memoria, es cualquier portador adecuado para la administración oral, que incluye a los portadores farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente. En determinadas formas de realización, las composiciones de alimento funcional según la invención comprenden suplementos de la dieta que, definidos en base a su función, incluyen agentes para potenciar el sistema inmune, agentes anti-inflamatorios, agentes antioxidantes, o mezclas de los mismos.

Los antioxidantes incluyen el aminoácido natural que contiene azufre, alicina, que actúa incrementando el nivel de enzimas anti-oxidantes en la sangre. Las hierbas y los extractos de hierbas, tales como el ajo, que contienen alicina son también antioxidantes efectivos. Las catequinas y los extractos de hierbas, tales como el té verde, que contienen catequinas, son también antioxidantes efectivos. Los extractos del género *Astragalus* también muestran actividad antioxidante. Los bioflavonoides, tales como quercetina, hesperidina, rutina, y mezclas de los mismos, son también antioxidantes efectivos. El papel beneficioso primario de los bioflavonoides podría ser proteger a la vitamina C de su oxidación en el cuerpo. Esto hace que más vitamina C, o ácido ascórbico, este disponible en el cuerpo para su uso.

Los bioflavonoides, tales como quercetina, son también agentes anti-inflamatorios efectivos, y se podrían usar como tales en las composiciones inventivas. Los suplementos de hierbas anti-inflamatorios y los compuestos anti-inflamatorios derivados de plantas o hierbas, se podrían usar como agentes anti-inflamatorios en la composición inventiva. Estos incluyen, bromolaína, una enzima proteolítica encontrada en la piña; los téis y los extractos de ortiga mayor; la cúrcuma, los extractos de cúrcuma, o la curcumina, un pigmento amarillo aislado de la cúrcuma.

Otros suplemento que se podrían usar en la presente invención es el jengibre, derivado de hierbas del género *Zingiber*. Se ha encontrado que éste posee actividad cardiotónica, debido a compuestos tales como el gingerol y el compuesto relacionado sogaol, así como proporciona beneficios en el tratamiento del vértigo y de trastornos vestibulares. El jengibre es efectivo también en el tratamiento de las náuseas y otros trastornos del estómago.

Los suplementos que ayudan a reconstruir las estructuras de los tejidos blandos, particularmente en la reconstrucción de cartílago, son útiles en composiciones para el tratamiento del dolor de la artritis y otros trastornos de las articulaciones. La glucosamina, el sulfato de glucosamina, la condroitina y el sulfato de condroitina son particularmente útiles para este propósito. La condroitina se podría derivar de distintas fuentes, tales como el cartílago de la cornamenta de alce (Elk Velvet Antler). También se conoce que los complejos de lípidos marinos, los complejos de ácidos grasos omega 3, y el aceite de pescado son útiles en el tratamiento del dolor asociado con artritis.

Los suplementos útiles para el tratamiento de los dolores de cabeza de tipo migraña incluyen la atanasia y el *Ginkgo biloba*. El ingrediente activo principal en la atanasia es la lactona sesquiterpénica partenolida, que inhibe la secreción de prostaglandinas que, a su vez, causan dolor mediante su actividad vaso espástica en los vasos sanguíneos. La atanasia presenta también propiedades anti-inflamatorias. El aceite de pescado, debido a sus acciones, estabilizadora de plaquetas y anti-vaso espástica, también podría ser útil en el tratamiento de dolores de cabeza de tipo migraña. La hierba *Ginkgo biloba* ayuda en el tratamiento de las migrañas al estabilizar las arterias y mejorar la circulación sanguínea.

Aunque algunos de los suplementos enumerados anteriormente, se han descrito por sus efectos farmacológicos, también se podrían utilizar otros suplementos en la presente invención y sus efectos están bien documentados en la bibliografía científica.

Los siguientes Ejemplos se ofrecen como forma de ilustración.

III. Ejemplos

Ejemplo I

Actividad antagonista de andrógenos del resto antioxidante de la vitamina E, 2,2,5,7,8-pentametil-6-cromanol, en células de carcinoma de próstata humano

A. Resumen

Los presentes inventores han mostrado que el resto antioxidante de la vitamina E, 2,2,5,7,8-pentametil-6-cromanol (PMCol), tiene actividad anti-andrógeno en células de carcinoma de próstata. En presencia de PMCol, la curva de crecimiento bifásico, estimulado por andrógenos, de las células del carcinoma de próstata humano LNCaP se desplaza hacia la derecha. El cambio en el crecimiento inducido por PMCol fue similar al producido por tratamiento con el anti-andrógeno puro bicalutamida (esto es, Casodex), lo que indica la actividad antagonista del receptor de andrógenos. La concentración de PMCol usada fue inferior a la concentración requerida para afectar al crecimiento o viabilidad en ausencia de andrógeno. Usando un ensayo de competición de la unión al receptor de andrógenos, se encontró que PMCol era un potente anti-andrógeno, tanto en células LNCaP como LAPC4, con una IC₅₀ de aproximadamente 10 μ M frente a 1 nM de R1881 (un andrógeno sintético estable). La liberación de antígenos específicos de próstata a partir de las células LNCaP, producida por exposición a andrógenos con 0,05 o con 1,0 nM de R1881, se inhibió un 100% y un 80%, respectivamente, por 30 μ M PMCol. También, PMCol inhibió la activación del promotor inducida por andrógenos, tanto en células LNCaP como LAPC4. Sin embargo, PMCol no afectó a los niveles de proteína del receptor de andrógenos, lo que sugiere que los efectos inhibidores de PMCol sobre las rutas androgénicas no se

debían a una expresión disminuida del receptor de andrógenos. Por lo tanto, la modulación del crecimiento por el resto antioxidante de la vitamina E en células de carcinoma de próstata sensibles a andrógenos, se debe, al menos en parte, a su potente actividad anti-androgénica.

B. Antecedentes

La actividad de los andrógenos es específica de tejido y mediada a través del receptor de andrógenos (RA). La disrupción de los andrógenos y de la actividad RA altera la regulación de los tejidos sensibles a andrógenos, tal como la glándula prostática (1). En la próstata, los andrógenos tienen un papel central en el desarrollo y en la función glandular normal (2). Sin embargo, los andrógenos son también necesarios para el desarrollo del cáncer de próstata. El papel de los andrógenos en el desarrollo del cáncer de próstata se enfatiza por la observación de que los eunucos y los hombres que tienen una mutación en la 5α -reductasa de tipo II, una enzima que convierte la testosterona a la forma dihidrotestosterona más potente, no desarrollan cáncer de próstata (3). La incidencia del cáncer de próstata ha continuado en aumento durante las últimas dos décadas, afectando actualmente a alrededor de 200.000 hombres cada año en Estados Unidos (4). Los agentes que permiten las acciones necesarias de los andrógenos para la función normal de los tejidos, a la vez que reducen el papel de los andrógenos en la patogénesis de los tejidos sensibles a andrógenos, podrían servir como un medio útil para reducir el desarrollo del cáncer de próstata. Recientemente, se han descrito varios agentes para prevenir el desarrollo del cáncer de próstata, tales como selenio, licopeno y vitamina E (5).

Debido a la naturaleza bioquímica de estos agentes, se piensa que actúan, principalmente, mediante rutas relacionadas con antioxidantes. Sin embargo, el alcance de su actividad biológica no se ha investigado exhaustivamente.

La vitamina E es una familia de factores de la dieta que se presentan de forma natural, que se identificaron originalmente como factores necesarios para la reproducción (6). La forma más potente de vitamina E, α -tocoferol, tiene dos componentes principales; una cadena de fitilo de dieciséis carbonos y un resto cromanol con cuatro sustituciones de grupo metilo (7). Biológicamente, se piensa que el α -tocoferol actúa principalmente como un antioxidante, reduciendo el daño oxidativo de los lípidos. El resto cromanol del α -tocoferol es responsable de su actividad antioxidante, mientras que la cadena fitilo aumenta la lipofilia del α -tocoferol y contribuye a su distribución tisular y subcelular (8). Los estudios en cultivos celulares que usan α -tocoferol son difíciles de realizar debido a su limitada solubilidad en agua. Sin embargo, el resto antioxidante cromanol del α -tocoferol, PMCol, que no posee una cadena fitilo, es suficientemente soluble en agua como para permitir la realización de estudios en cultivos celulares. El α -tocoferol y el PMCol se muestran en la Figura 1 junto con PMC.

La mayoría de las líneas celulares de carcinoma de próstata humano son independientes de andrógenos. La línea celular de carcinoma de próstata humano LNCaP es una de las pocas líneas celulares que muestran respuestas demostrables a la exposición a andrógenos (9). Interesantemente, las células LNCaP producen una respuesta de crecimiento bifásico a la exposición a andrógenos, produciéndose la estimulación del crecimiento a dosis inferiores y produciéndose la inhibición del crecimiento en ausencia de andrógenos o en presencia de altos niveles de andrógenos (9, 10). Además, se inducen distintas respuestas sensibles a andrógenos en células LNCaP. Por ejemplo, las células LNCaP producen un incremento dependiente de la dosis en la expresión de PSA tras la exposición a andrógenos (11, 12). También, los promotores sensibles a andrógenos, tales como el promotor MMTV, se activan por andrógenos en células LNCaP (13). La exquisita sensibilidad de las células LNCaP a la estimulación androgénica se podría deber a una mutación en el dominio de unión del ligando del receptor de andrógenos (14). Hasta la fecha, la línea celular de próstata LNCaP ha sido la línea celular de próstata caracterizada más exhaustivamente para examinar los efectos de los andrógenos. Más recientemente, la línea celular LAPC4 se ha presentado como otra línea celular de carcinoma de próstata humano sensible a andrógenos, que expresa un RA normal (15). Sin embargo, la respuesta de células LAPC4 a andrógenos no es tan pronunciada como la observada en células LNCaP. Colectivamente, las líneas celulares de carcinoma de próstata humano LNCaP y LAPC4 proporcionan modelos valiosos para investigar las rutas celulares reguladas por andrógenos.

Los estudios previos se han enfocado, principalmente, en la inhibición del crecimiento de las células de próstata por el tratamiento con vitamina E, que podría ocurrir mediante efectos en los reguladores del ciclo celular (16, 17, 18). Las respuestas apoptóticas inducidas por tratamiento con vitamina E se han observado también en células LNCaP (19, 20). Interesantemente, las respuestas apoptóticas inducidas por vitamina E aumentaron por co-administración de andrógenos (19). Zhang *et al.* (21) describieron que el succinato de vitamina E reduce el nivel de RA en células LNCaP, resultando en la inhibición de respuestas mediadas por andrógenos. Sin embargo, las acciones directas de la vitamina E y compuestos relacionados sobre la actividad del receptor de andrógenos en células de próstata no se ha examinado de forma exhaustiva. En el estudio descrito a continuación, la actividad antagonista del receptor de andrógenos y la modulación de las rutas sensibles a andrógenos por el derivado de la vitamina E, PMCol, fueron investigadas por los presentes inventores en células de carcinoma de próstata humano.

C. Materiales y métodos

Compuestos químicos. PMCol y PMC se obtuvieron de Aldrich (Milwaukee, WI). Las estructuras químicas del α -tocoferol, PMCol y PMC se muestran en la Figura 1. La bicalutamida (Casodex) fue proporcionada amablemente por AstraZeneca Pharmaceuticals (Wilmington, DE). R1881 y ^3H -R1881 (87 Ci/mmol) se obtuvieron de Perkin Elmer/NEN Life Science Products (Boston, MA). El resto de los compuestos químicos usados en estos estudios se adquirieron en Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO).

Cultivos celulares. Las células LNCaP se adquirieron en la American Type Culture Collection (Manassas, VA) y las células LAPC4 fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Robert Reiter (University of California - Los Angeles) y se mantuvo en DMEM que contenía 5% de suero de ternera fetal inactivado por calor (Sigma) con los antibióticos estreptomycin-penicilina (denominado DMEM/FBS) en un incubador con un 5% de CO₂ a 37°C. Para experimentos

que evalúan las respuestas androgénicas, las células se cultivaron en DMEM sin rojo de fenol (Gibco/BRL, Calsbad, CA) que contenía un 4% de suero de ternera fetal tratado con carbón activo y un 1% de suero de ternera fetal sin tratar (denominado DMEM/CSS).

Ensayo de competición de la unión del receptor de andrógenos. Se realizó un ensayo de competición de la unión del receptor de andrógenos como se describió previamente (22). Las células de carcinoma de próstata humano LNCaP o LAPC4 se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 12-pocillo (Costar, Corning, NY) a $3,0 \times 10^5$ células por pocillo en DMEM/CSS sin rojo de fenol, 3 días antes del análisis. Para los ensayos de competición, se retiró el DMEM/CSS por aspiración y se reemplazó con 1 ml de DMEM sin rojo de fenol que contenía 1 nM de ³H-R1881, 1 μM de triamcinolona acetónico y el competidor a las concentraciones especificadas, durante 2 horas a 37°C, en un incubador con un 5% de CO₂. Después de la incubación, la disolución del competidor se aspiró y las células se retiraron de la placa por tripsinización y se colocaron en tubos de poliestireno de 12x75 mm. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de DMEM sin rojo de fenol y se pusieron en 8,0 ml de la mezcla de centelleo ScintiVerse II (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) para la determinación de la radiactividad (esto es, dpm), usando un sistema de centelleo líquido Beckman LS 6000TA (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA).

Análisis de la viabilidad y del crecimiento celular. Cinco mil células LNCaP y LAPC4 se sembraron en cada uno de los pocillos de placas de 96 pocillos (Costar) en 100 μl de DMEM/CSS. De 2 a 3 días después de la siembra, las células se trataron por la adición de 100 μl de DMEM/CSS que contenía 2 x la concentración del tratamiento especificado, a cada pocillo. Cuatro días después del tratamiento, se estimó el número relativo de células mediante la determinación de la concentración de ADN de cada pocillo usando un ensayo Hoechst, basado en la fluorescencia del ADN, como se describió previamente (23). El análisis de crecimiento con células DU145 se realizó de forma similar a los llevados a cabo con células LNCaP y LAPC4, excepto que las células DU145 se sembraron inicialmente a 500 células por pocillo. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de exclusión de azul tripán y se cuantificó mediante análisis por microscopía óptica, usando un hemocitómetro.

Determinación de los niveles de PSA secretados. Las células LNCaP se cultivaron en placas de 96 pocillos (Costar) a 5.000 células por pocillo en DMEM/CSS, un día antes del tratamiento. Cuarenta y ocho horas después del tratamiento, se determinaron los niveles de PSA en el medio de cultivo celular usando un kit Tandem-MP PSA (Beckman Coulter, Inc.) según las instrucciones del fabricante. Los niveles de PSA se normalizaron respecto a los niveles de ADN, determinados usando el ensayo Hoechst basado en la fluorescencia del ADN (23).

Análisis del ensayo de un promotor indicador estimulado por andrógenos. Las líneas celulares de carcinoma de próstata LNCaP y LAPC4 se cultivaron en placas de cultivo celular de 12 pocillos (Costar) en DMEM/CSS, de 2 a 3 días antes de la transfección. La activación transcripcional inducida por andrógenos se determinó usando una construcción indicadora, con un promotor MMTV que regula la expresión de luciferasa (24). Las células LNCaP y LAPC4 se transfectaron con el plásmido MMTV/luciferasa usando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen Inc., Valencia, CA), según las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se trataron con R1881, con o sin reactivos bajo análisis, a las concentraciones especificadas. Los extractos celulares se adquirieron 24 a 48 horas después del tratamiento mediante la retirada del medio, el lavado con 1 x PBS y la obtención del extracto con 200 μl de 1 x tampón de lisis del indicador (Promega, Madison, WI). La actividad luciferasa se determinó como se describió previamente (24).

Análisis por Inmunoblot de los niveles de proteína RA. Las células LNCaP se sembraron a una densidad de 1×10^6 células por placa de cultivo celular de 100 mm, en 10 ml de DMEM/FBS y se mantuvieron en incubadores a 37°C en 5% de CO₂. Después de 5 días de tratamiento con vehículo, 30 μM PMC, 30 μM PMCol o 1,0 μM de bicalutamida, las células se lavaron con 1 x PBS frío y se lisaron en un tampón que contenía 1,0% de Nonidet P-40, 0,5% de deoxicolato sódico, 0,1% de dodecil sulfato sódico, 0,1 mg/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 mM de ortovanadato sódico y 10 μg/ml de aprotinina, en 1 x PBS. La proteína total (10 μg) de los extractos celulares se sometió a electroforesis sobre geles del 7,5% de SDS-poliacrilamida y se transfirió a membranas Immobilon-P (Millipore Corp., Bedford, MA) usando el sistema de transferencia húmedo GENIE (Idea Scientific, Minneapolis, MN). Las membranas se bloquearon en solución salina tamponada con Tris que contenía un 5% de leche desnatada en polvo y, posteriormente, se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-RA (441) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y un anticuerpo de ratón anti-actina (A5441; Sigma). Posteriormente, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y se analizaron usando el reactivo Enhanced Chemiluminescence Plus (Amersham Pharmacia Biotech). Los autorradiogramas se prepararon por exposición de los blots a películas BioMax Light X-ray (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) y se revelaron usando un procesador CURIX 60 CP (Agfa, Ridgefield Park, NJ).

Análisis estadístico. Las diferencias significativas en los valores entre grupos se determinaron usando una prueba bilateral de la T de Student. Se usaron valores de P inferiores a 0,05 para indicar significación estadística.

D. Resultados

PMCol inhibe la unión de andrógenos en células de cáncer de próstata. La competición por RA se determinó usando ^3H -R1881 en la línea celular LNCaP, sensible a andrógenos, que expresa un mutante de RA funcional (25), y en la línea celular LAPC4, que expresa un RA humano normal (15). Se encontró que concentraciones crecientes del antagonista de RA, bicalutamida, inhibían de forma progresiva la unión de R1881 (Figura 2A), con una IC_{50} estimada de $0,7 \mu\text{M}$ en células LAPC4. Se encontró que PMCol era aproximadamente 10 veces menos potente que la bicalutamida, como competidor de ^3H -R1881 en células LAPC4, con una IC_{50} estimada de $7,2 \mu\text{M}$ (Figura 2A). Los estudios repetidos de competición de PMCol por la unión de ^3H -R1881 mostraron valores IC_{50} en el intervalo de 5 a $15 \mu\text{M}$ (datos no mostrados). Contrastando con esto, PMC, en el que está ausente el hidroxilo en 6 de PMCol, tenía una actividad anti-androgénica menor que PMCol (Figura 2A) y reducía significativamente la viabilidad celular a una concentración de $100 \mu\text{M}$, a las dos horas del tratamiento (datos no mostrados). En base a los resultados de competición con R1881 en células LAPC4 (Figura 2A), se usó una dosis de $30 \mu\text{M}$ PMC y PMCol en la mayoría de estos estudios, lo que permitió una comparación efectiva de la actividad anti-androgénica entre PMC y PMCol. En células LAPC4, el tratamiento con $30 \mu\text{M}$ PMCol producía una disminución del 75% en la unión de ^3H -R1881 y el tratamiento con $1 \mu\text{M}$ de bicalutamida producía una disminución del 62% en la unión de ^3H -R1881 (Figura 2B).

Modulación del crecimiento celular del carcinoma de próstata y de la viabilidad por PMCol. Los cambios en el crecimiento de la línea celular de carcinoma de próstata DU145, independiente de andrógenos, y de las líneas celulares de próstata LNCaP y LAPC4, sensibles a andrógenos, se determinaron a concentraciones de PMCol en el intervalo entre 10 y $100 \mu\text{M}$ (Figura 3A). Se requirieron concentraciones de $50 \mu\text{M}$, $60 \mu\text{M}$ y $80 \mu\text{M}$, o más PMCol, para reducir significativamente el crecimiento celular en las células LNCaP, LAPC4 y DU145, respectivamente (Figura 3A). Las células LNCaP producen una respuesta de crecimiento bifásico frente a la exposición con andrógenos (9). La modulación del crecimiento celular de LNCaP por tratamiento con PMCol se examinó a lo largo de 4 días. PMCol no tenía actividad moduladora del crecimiento en células LNCaP control tratadas con vehículo, en medio deficiente en andrógenos (esto es, PMCol no tenía actividad agonista RA) a concentraciones en el intervalo de $10 \mu\text{M}$ a $30 \mu\text{M}$ de PMCol (Figura 3B). Sin embargo, el crecimiento celular de LNCaP disminuyó, a concentraciones iguales o superiores a $40 \mu\text{M}$ PMCol (Figura 3B), y concentraciones de PMCol de $100 \mu\text{M}$ o superiores producían una muerte celular significativa, a 48 y 96 h (Tabla I). La estimulación del crecimiento de LNCaP por exposición a $0,1 \text{ nM}$ R1881 se inhibió significativamente por tratamiento con concentraciones de $10 \mu\text{M}$ o más de PMCol (Figura 3B). Sin embargo, se observó una estimulación significativa en el crecimiento de LNCaP en presencia de una concentración, normalmente inhibidora del crecimiento, de $1,0 \text{ nM}$ R1881, con tratamiento de $10 \mu\text{M}$ a $30 \mu\text{M}$ de PMCol (Figura 3B). La curva de crecimiento estimulada por R1881 de células LNCaP se desplazó hacia la derecha en presencia de $30 \mu\text{M}$ PMCol, de forma similar a la producida por tratamiento con $1 \mu\text{M}$ bicalutamida (Figura 4). Se observó un desplazamiento hacia la derecha más modesto, pero significativo, en la curva de crecimiento de LNCaP, inducida por andrógenos, por tratamiento con $30 \mu\text{M}$ PMC (Figura 4).

TABLA 1

Cambios dependientes del tiempo y de la dosis en la viabilidad celular de LNCaP después del tratamiento con PMCol

Tiempo (h)	% de viabilidad celular ^a (DS)					
	[PMCol] (μM)					
	0	25	50	75	100	250
48	92,3 (4,7)	90,0 (2,8)	88,0 (3,4)	80,0 (12,5)	71,0 (8,7) ^b	11,0 (8,6) ^b
96	88,0 (2,5)	87,0 (4,8)	85,0 (4,6)	87,0 (4,0)	21,0 (3,3) ^b	2,0 (1,8) ^b

^a Determinada por análisis de exclusión de azul tripán y cuantificado usando un hemocitómetro.

^b Significativamente diferente en comparación con $0 \mu\text{M}$ PMCol ($P < 0,05$, $n=4$).

Inhibición de la secreción de PSA por PMCol en células LNCaP. La secreción de PSA por células LNCaP se estimula por exposición a andrógenos, de una forma dependiente de la dosis (12). La producción de PSA estimulada por R1881 a partir de células LNCaP se midió después del tratamiento con PMCol durante 48 horas. La liberación de

PSA por las células LNCaP no se afectó por el tratamiento con 30 μ M de PMCol solo (Figura 5). Sin embargo, los niveles de PSA se incrementaron 3,1 veces después de la exposición a una dosis estimuladora del crecimiento de 0,05 nM R1881, que es inhibió completamente por el tratamiento con 30 μ M PMCol (Figura 5). La exposición de células LNCaP a 1,0 nM R1881 produjo un incremento de los niveles de PSA de 12 veces en 48 horas, que disminuyó al 20%, 81% y 43% por tratamiento con 30 μ M PMC, 30 μ M PMCol o 1 μ M de bicalutamida, respectivamente (Figura 5).

Inhibición de la activación transcripcional estimulada por andrógenos por PMCol. Se realizaron estudios sobre la activación transcripcional regulada por andrógenos en células LNCaP y LAPC4, transfectadas de forma transitoria con un vector indicador que usa el promotor MMTV/LTR, sensible a andrógenos, para dirigir la expresión del gen indicador luciferasa. En células LNCaP, el tratamiento sólo con PMCol no tenía efecto sobre la actividad del promotor MMTV, mientras que se incrementó la expresión de luciferasa 54 veces después de la exposición a 1,0 nM R1881 durante 24 horas (Figura 6A). La expresión de luciferasa inducida por exposición a 1,0 nM R1881 en células LNCaP, durante 24 horas, disminuyó un 50% y un 70% por tratamiento con 25 μ M y 50 μ M PMCol, respectivamente (Figura 6A). De forma similar, las células LAPC4 expuestas a 1,0 nM R1881 produjeron un incremento de 20 veces en la expresión de luciferasa dirigida por MMTV/LTR, que se disminuyó un 60% por tratamiento con 30 μ M PMCol, después de 24 horas (Figura 6B). Tanto en células LNCaP como en células LAPC4, el tratamiento con 1 μ M bicalutamida disminuyó la expresión de luciferasa estimulado por 1,0 nM R1881 en un 50% aproximadamente (Figuras 6A y 6B).

Niveles de proteína del receptor de andrógenos en células LNCaP expuestas a PMCol. Estudios previos en células LNCaP habían mostrado que los niveles de RA disminuían después del tratamiento con análogos de la vitamina E, lo que podría dar cuenta de la sensibilidad reducida de estas células a la exposición con andrógenos (21). Sin embargo, en el presente estudio, las células LNCaP tratadas con 30 μ M PMC, 30 μ M PMCol o 1 μ M bicalutamida, durante 5 días, no dio como resultado unos niveles de proteína RA alterados. (Figura 7).

E. Discusión

En el presente estudio, los inventores han examinado los efectos de un agente tradicionalmente considerado como un antioxidante sobre células de carcinoma de próstata. Los estudios epidemiológicos proporcionan la interesante evidencia de que los factores de la dieta antioxidantes, tales como β -licopeno y vitamina E, podrían ayudar a prevenir el desarrollo del cáncer de próstata (5). Aunque estos agentes se han clasificado como antioxidantes, el mecanismo por el que podrían contribuir a la prevención del cáncer de próstata no se ha establecido firmemente. Se sabe que los andrógenos tienen un papel esencial en el desarrollo del cáncer de próstata (3). La modulación de la actividad de los andrógenos podría proporcionar un medio para la prevención del cáncer de próstata (26). En esta memoria, los inventores han determinado que el resto antioxidante de la vitamina E, PMCol, es un potente anti-andrógeno en células de carcinoma de próstata humano sensibles a andrógenos.

La línea celular de carcinoma de próstata humano LNCaP es una de las pocas líneas celulares de próstata que muestran cambios fisiológicos demostrables que resultan de la exposición a andrógenos, tal como la modulación de su crecimiento (9). Por lo tanto, la línea celular LNCaP tiene un valor demostrado en la identificación de agentes que alteran el crecimiento celular estimulado por andrógenos. En el presente estudio, PMCol desplaza la curva de crecimiento mediada por andrógenos en células LNCaP, de forma que se necesitaban concentraciones de andrógenos mayores para producir la respuesta de crecimiento bifásico, observada normalmente en células LNCaP. El desplazamiento del crecimiento de células LNCaP por tratamiento con PMCol fue suficiente para producir una estimulación del crecimiento en presencia de 1,0 nM R1881, una concentración de R1881 que normalmente inhibe la proliferación de células LNCaP (10). El desplazamiento en el patrón de crecimiento de células LNCaP observado por tratamiento con PMCol fue similar al observado en células LNCaP después del tratamiento con el anti-andrógeno puro bicalutamida. También, la IC₅₀ de PMCol, observada en un análisis de competición de andrógenos, por la unión de R1881 en células LNCaP, está de acuerdo con el desplazamiento de la curva dosis-respuesta en el crecimiento mediado por andrógenos de células LNCaP, después del tratamiento con PMCol. En conjunto, estos resultados sugieren que el desplazamiento observado en el crecimiento de células LNCaP mediado por andrógenos fue debido a la actividad anti-androgénica de PMCol.

Aunque se ha demostrado que las células LNCaP son útiles para evaluar las rutas de respuesta a andrógenos, el uso de células LNCaP para determinar la actividad anti-androgénica puede ser inexacto ya que las células LNCaP expresan un RA mutante (25). El receptor RA en las células LNCaP que, aunque es funcional, se ha descrito que tiene una afinidad de unión del ligando alterada (14) y se estimula por algunos agentes que son antagonistas para el receptor RA de tipo salvaje (22). Por lo tanto, en este estudio, la competición por la unión a RA de PMCol se determinó también en la línea celular de carcinoma de próstata humano LAPC4, que expresa un RA de tipo salvaje (15). Se encontró que la competición de PMCol por la unión de R1881 era similar en células LNCaP y LAPC4. Además, se observó que el anti-andrógeno puro bicalutamida tenía una actividad competidora equivalente en células LNCaP y LAPC4. Por lo tanto, se encontró que el anti-andrógeno puro bicalutamida y PMCol poseían una actividad antagonista de RA comparable en células LNCaP, que expresan un mutante de RA funcional, y en células LAPC4, que expresan un RA normal.

El receptor RA funciona, principalmente, como un factor de transcripción que se activa por unión de andrógenos (1). En estos estudios, se usó el promotor MMTV, que responde a andrógenos, para determinar la modulación de la actividad transcripcional estimulada por andrógenos. Tras la exposición a andrógenos (esto es, R1881), la actividad del promotor MMTV se estimuló, tanto en células LNCaP como en células LAPC4. También, en ambas líneas celulares,

la estimulación por R1881 de la actividad MMTV se inhibió significativamente por el tratamiento con PMCol. El tratamiento con PMCol solo, no estimulaba la actividad de promotor MMTV (esto es, no se observó que PMCol tuviera una actividad agonista o agonista parcial). Los efectos de la exposición a andrógenos sobre la activación transcripcional, se observaron adicionalmente por la inhibición de la liberación de PSA, estimulada por andrógenos, después del tratamiento con PMCol en células LNCaP. Previamente, se había descrito que el succinato de vitamina E inhibía los efectos de los andrógenos en células LNCaP, mediante la regulación negativa de los niveles del receptor de andrógenos (21). Se ha mostrado que otros agentes, tales como la curcumina, disminuyen la expresión de RA en células LNCaP (27). En el presente estudio, en células LNCaP tratadas con 30 μ M PMCol durante 5 días, los niveles de proteína RA no se afectaban. Así, se observó que PMCol era un potente inhibidor de la activación transcripcional de los promotores que responden a andrógenos, probablemente mediante el bloqueo directo de la activación de RA por andrógenos.

En el presente estudio, PMC, al que le falta el grupo hidroxilo fenólico presente en PMCol, fue menos potente que PMCol como inhibidor de las respuestas androgénicas. Por lo tanto, el grupo hidroxilo fenólico del anillo cromanol contribuye significativamente a la actividad androgénica de PMCol. Otras formas de vitamina E, tales como el β -, γ - y δ -tocoferol, difieren del α -tocoferol en el número y en la localización de sustituciones del grupo metilo sobre el anillo cromanol (7). Los inventores pueden proponer que los restos antioxidantes de otras formas de vitamina E también poseen actividad anti-androgénica, con potencias que varían dependiendo de las sustituciones específicas del grupo metilo presentes en el anillo cromanol.

Se han identificado distintos agentes de la dieta que tienen actividad anti-androgénica en células de carcinoma de próstata. Sin embargo, el mecanismo de la actividad anti-androgénica observado para anti-andrógenos de la dieta podría variar. Por ejemplo, se ha descrito que la curcumina, un componente de la cúrcuma, regula negativamente los niveles de proteína del receptor de andrógenos en células LNCaP, atenuando de forma efectiva las respuestas androgénicas (27). En contraste con esto, se ha descrito que el indol-3-carbinol, un componente de los vegetales crucíferos, cuando se convierte a diindolilmetano, actúa como un potente inhibidor de la unión de andrógenos en células LNCaP, pero no afecta a los niveles de proteína del RA (28). Zhang *et al.* (21), han descrito que el succinato de vitamina E es inhibidor de las respuestas androgénicas en células LNCaP mediante la regulación negativa de los niveles de proteína del RA, de forma similar a la acción de la curcumina. En contraste con esto, en el presente estudio, los inventores han encontrado que el resto antioxidante de la vitamina E, PMCol, bloquea de forma efectiva la unión de andrógenos al RA sin afectar a los niveles de proteína RA, de forma similar a los efectos observados con los derivados indol-3-carbinol (28). Por tanto, los anti-andrógenos de la dieta podrían servir como un medio efectivo de modulación de las rutas androgénicas mediante distintos mecanismos que afectan a la actividad del RA.

PMCol ha sido investigado extensamente por su actividad antioxidante asociada con que es el resto antioxidante de la vitamina E. Por ejemplo, se ha mostrado que la potencia antioxidante de PMCol es similar a la del α -tocoferol *in vitro* (29). En general, los niveles en plasma de α -tocoferol están en el intervalo entre 5 y 30 μ M (30), dentro del intervalo de actividad anti-androgénica observado para PMCol en el presente estudio. Debido a la alta lipofilia de la vitamina E, es difícil determinar su actividad anti-androgénica mediante análisis en cultivos celulares. Sin embargo, debido a la presencia de la cadena fitilo, altamente lipofila, la distribución subcelular de la vitamina E limitaría su interacción directa con el RA, que reside en compartimentos subcelulares más acuosos, tales como el citoplasma y el núcleo. La vitamina E se puede metabolizar a derivados con mayor solubilidad en agua, tales como α CEHC (7, 31), que son estructuralmente similares a PMCol y podrían tener una mayor solubilidad en agua y una bio-disponibilidad celular distinta, en comparación con la vitamina E. De esta forma, los metabolitos de la vitamina E podrían entrar en contacto con el RA *in vivo* y tener una actividad anti-androgénica, análoga a la producida por PMCol en células de carcinoma de próstata humano.

En resumen, los presentes inventores han encontrado que el resto antioxidante de α -tocoferol, PMCol, inhibe la actividad de los andrógenos, probablemente mediante la competición por la unión de los andrógenos al RA, que resultaría en la inhibición de las rutas biológicas sensibles a andrógenos. No se ha encontrado que PMCol posea una actividad agonista o agonista parcial de los andrógenos y, por ello, funciona como un antagonista puro de la actividad de los andrógenos en las líneas celulares de carcinoma de próstata LNCaP y LAPC4. En base a los resultados del presente estudio, PMCol podría servir como un agente útil para la modulación de la actividad de los andrógenos *in vivo*. De forma importante, la actividad anti-androgénica de PMCol plantea la posibilidad de que la actividad preventiva del cáncer de próstata de la vitamina E podría deberse, en parte, a los efectos anti-androgénicos de la vitamina E o de metabolitos de la vitamina E en la próstata. Actualmente, alrededor de 30.000 hombres mueren cada año de cáncer de próstata en los Estados Unidos (4). La prevención del cáncer de próstata mediante la acción de PMCol y sus derivados, ofrece un medio efectivo de reducir la devastación producida por la enfermedad.

Ejemplo 2

Toxicidad oral aguda en ratones

La toxicidad oral de PMCol se determinó en ratones FVB macho de 6 meses de edad. Una única dosis oral alta de 1000 mg/kg de PMCol en aceite de sésamo, se administró a 4 ratones por alimentación forzada. Cuatro ratones control recibieron sólo aceite de sésamo por alimentación forzada (control de vehículo). No hubo ningún cambio significativo en el comportamiento animal o en su masa corporal (Figura 8A) después de la administración de PMCol o de vehículo, como control, hasta una semana después de la administración de PMCol. En un segundo estudio,

cuatro ratones FVB macho de 6 meses de edad recibieron 200 mg/kg de PMCol diariamente en aceite de sésamo, por alimentación forzada durante 10 días. Tres ratones que recibieron únicamente aceite de sésamo (control de vehículo) se usaron como controles. Los pesos corporales se determinaron diariamente y todos los ratones fueron sometidos a autopsia, para examinar cambios grandes en los órganos, en el día 11. No se observaron diferencias significativas en el cambio de masa corporal al comparar ratones tratados con PMCol y ratones control tratados con vehículo, a lo largo de 10 días (Figura 8B). No se observaron cambios grandes en los órganos ni en los ratones tratados con PMCol ni en los controles. Por ejemplo, el peso del hígado no varió significativamente en ratones que recibieron PMCol durante 10 días (Figura 8C). Por lo tanto, el LD50 de PMCol en ratones es superior que la dosis mayor analizada (esto es, 1000 mg/kg de peso corporal) y PMCol se tolera bien en ratones a dosis altas durante un tiempo de hasta 10 días.

Ejemplo 3

Determinación in vivo de la eficacia de un anti-andrógeno derivado de cromano usando el modelo de injerto heterólogo de células LNCaP y el modelo de carcinogénesis de próstata TRAMP

Un modelo de injerto heterólogo en ratones “nude” (desnudo)/células NCaP, similar al procedimiento de injerto heterólogo de células DU145 descrito previamente (Church *et al.*, Cancer Chemother. Pharmacol. 43: 198-204 (1999)), se podría usar para examinar *in vivo* las acciones de PMCol en el crecimiento de células de carcinoma de próstata humano. Ratones macho Hsd: atímicos nude-nu (*nu/nu*, origen BALB/c) de 4 semanas de edad se adquirirán en Harlan Sprague Dawley (Madison, WI). A las 6 semanas de edad, a cada uno de los ratones se le injertarán subcutáneamente 10⁶ células heterólogas LNCaP en 0,1 ml de medio + 0,1 ml de Matrigel (BD Biosciences) en la región que flanquea las almohadillas de grasa ventrales. Una semana después del injerto heterólogo con células LNCaP, los ratones se dividirán en 5 grupos de tratamiento de 10 ratones cada uno. Los ratones del grupo 1 recibirán, como control de vehículo, 0,25 ml de aceite de maíz por alimentación forzada; el grupo 2 recibirá 25 mg/kg de flutamida (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) como un control de tratamiento anti-andrógenos; el grupo 3 recibirá 25 mg/kg de PMCol en 0,25 ml de aceite de maíz; y el grupo 4 recibirá 100 mg/kg de PMCol en 0,25 ml de aceite de maíz. Las dosificaciones se basan en los estudios de toxicidad descritos anteriormente. El grupo 5 se castrará 1 semana después del injerto heterólogo de células LNCaP, como un control de un nivel de andrógenos bajo. Cada uno de los ratones se tratará diariamente durante 2 meses. El crecimiento del tumor LNCaP se determinará dos veces a la semana y se determinará el volumen del tumor. Dos meses después del injerto heterólogo con células LNCaP, los ratones se sacrificarán y se extraerán todos los tumores LNCaP y se fijarán con 10% de formalina para el examen histológico mediante microscopía óptica. En el momento de la eutanasia, la sangre se recogerá para determinar los niveles de testosterona, de hormona luteinizante y de PMCol en la circulación, según se indicará más adelante. También, se extraerán los hígados y los órganos sexuales accesorios (esto es, vesículas seminales y lóbulos prostáticos) de cada ratón para el análisis de los efectos de PMCol sobre estos tejidos.

El modelo de carcinogénesis de próstata TRAMP se usará para determinar la actividad anti-androgénica de PMCol sobre el crecimiento tumoral dependiente de andrógenos, en la próstata de ratón usando una colonia de ratones TRAMP, mantenida en el fondo genético C57BL/6. A los 3 meses de edad, antes del inicio de la carcinogénesis de próstata, los machos TRAMP heterocigotos se dividirán en 5 grupos de tratamiento, como se describió anteriormente. Se ha descrito la eficacia de la flutamida en el modelo TRAMP (Raghow *et al.*, Cancer Res. 60: 4093-4097 (2000)). Los ratones TRAMP bajo estudio se tratarán diariamente. Cuatro meses después del inicio del tratamiento, punto en el que aproximadamente el 50% de los ratones muestra adenocarcinomas prostáticos demostrables, los ratones se sacrificarán y los lóbulos de la próstata y las glándulas sexuales accesorias se extraerán y se fijarán en 10% de formalina y se prepararán para análisis histológico. Las preparaciones de glándulas de próstata teñidas con hematoxilina y eosina se examinarán para determinar la presencia de adenocarcinomas prostáticos, que se cuantificarán para cada grupo de tratamiento y se usarán para determinar la incidencia de los carcinomas de próstata en el grupo control frente al grupo de tratamiento. También, se recogerá sangre para determinar los niveles de testosterona, de hormona luteinizante y de PMCol en la circulación, según se indicará más adelante.

La determinación del efecto del análogo de la vitamina E, PMCol, sobre el control por retroalimentación en el sistema nervioso central de la testosterona y de la hormona luteinizante, en comparación con los niveles en sangre de PMCol, se realizará como sigue. Ratones ICR macho de cuatro meses de edad (Harlan Sprague Dawley) se usarán para analizar el efecto de la administración de PMCol sobre los niveles de testosterona en sangre. Los ratones se dividirán en 5 grupos de 5 ratones cada uno. Los ratones en el grupo 1 recibirán, como control de vehículo, 0,25 ml de aceite de maíz por alimentación forzada, el grupo 2 recibirá 25 mg/kg de flutamida (Sigma) como un tratamiento control anti-andrógenos, el grupo 3 recibirá 25 mg/kg de PMCol en 0,25 ml de aceite de maíz y el grupo 4 recibirá 100 mg/kg de PMCol en 0,25 ml de aceite de maíz. El grupo 5 se castrará como control de un nivel de andrógenos bajo. Los ratones se tratarán diariamente durante 1 mes y se recogerán muestras de sangre dos veces a la semana por sangrado retro-orbital, como se ha realizado previamente (Church *et al.*, 1999). Los niveles de testosterona en sangre se determinarán usando un kit de ensayo por EIA de testosterona (BioCheck, Inc, Burlingame, CA). Además, los niveles en sangre de testosterona determinados por el kit de EIA, se validará usando LC-MC. Los niveles de hormona luteinizante en las muestras de sangre se determinará usando el kit de EIA de hormona luteinizante (BioCheck, Inc, Burlingame, CA) según las instrucciones del kit. Finalmente, los niveles en sangre de PMCol se determinarán a partir de las muestras usando LC-MS.

Referencias

1. **Lamb, D.J., Weigel, N.L., and Marcelli, M.** Androgen receptors and their biology. *Vit. Horm.*, 62: 199-229, 2001.
2. **Wilding, G.** The importance of steroid hormones in prostate cancer. *Cancer Surv.*, 14: 113-130, 1992.
3. **Wilding, G.** Endocrine control of prostate cancer. *Cancer Surv.*, 23: 43-62, 1995.
4. **Jemal, A., Murray, T., Samuels, A., Ghafoor, A., Ward, E., and Thun, M.J.** Cancer Statistics, 2003. *CA Cancer J. Clin.*, 53: 5-26, 2003.
5. **Gronberg, H.** Prostate cancer epidemiology. *Lancet*, 361: 859-864, 2003.
6. **Evans, H.M. and Bishop, K.S.** On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 56: 650-651, 1922.
7. **Brigelius-Flohe, R. and Traber, M.G.** Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.*, 13: 1145-1155, 1999.
8. **Burton, G.W. and Traber, M.G.** Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.*, 10: 357-382, 1990.
9. **Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., and Murphy, G.** LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.*, 43: 1809-1818, 1983.
10. **Ripple, M.O., Henry, W.F., Rago, R.P., and Wilding, G.** Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 40-48, 1997.
11. **Riegman, P. H., Vlietstra, R.J., van der Korput, J.A., Brinkmann, A.O., and Trapman, J.** The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Mol. Endocrinol.*, 5: 1921-1930, 1991.
12. **Young, C.Y., Montgomery, B.T., Andrews, P.E., Qui, S.D., Bilhartz, D.L., and Tindall, D.J.** Hormonal regulation of prostate-specific antigen messenger RNA in human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Cancer Res.*, 51: 3748-3752, 1991.
13. **Warriar, N., Page, N., Koutsilieris, M., and Govindan, M.V.** Anti-androgens inhibit human androgen receptor-dependent gene transcription activation in the human prostate cancer cells LNCaP. *Prostate*, 24: 176-186, 1994.
14. **Veldscholte, J., Berrevoets, C.A., and Mulder, E.** Studies on the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 49: 341-346, 1994.
15. **Klein, K.A., Reiter, R.E., Redula, J., Moradi, H., Zhu, X.L., Brothman, A.R., Lamb, D.J., Marcelli, M., Beldegrun, A., Witte, O.N., and Sawyers, C.L.** Progression of metastatic human prostate cancer to androgen independence in immunodeficient SCID mice. *Nat. Med.*, 3: 402-408, 1997.
16. **Israel, K., Sanders, B.G., and Kline, K.** RRR- α -tocopherol succinate inhibits the proliferation of human prostatic tumor cells with defective cell cycle/differentiation pathways. *Nutr. Cancer*, 24: 161-169, 1995.
17. **Venkateswaran, V., Fleshner, N.E., and Klotz, L.H.** Modulation of cell proliferation and cell cycle regulators by vitamin E in human prostate carcinoma cell lines. *J. Urol.*, 168: 1578-1582, 2002.
18. **Ni, J., Chen, M., Zhang, Y., Li, R., Huang, J., and Yeh, S.** Vitamin E succinate inhibits human prostate cancer cell growth via modulating cell cycle regulatory machinery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300: 357-363, 2003.
19. **Gunawardena K, Murray DK, Meikle AW.** Vitamin E and other antioxidants inhibit human prostate cancer cells through apoptosis. *Prostate*, 44: 287-295, 2000.
20. **Israel K, Yu W, Sanders BG, Kline K.** Vitamin E succinate induces apoptosis in human prostate cancer cells: role for Fas in vitamin E succinate-triggered apoptosis. *Nutr. Cancer*, 36: 90-100, 2000.
21. **Zhang, Y., Ni, J., Messing, E.M., Chang, E., Yang, C.R., and Yeh, S.** Vitamin E succinate inhibits the function of androgen receptor and the expression of prostate-specific antigen in prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 7408-7413, 2002.
22. **Wilding, G., Chen, M., and Gelmann, E.P.** Aberrant response *in vitro* of hormone-responsive prostate cells to anti-androgens. *Prostate*, 14: 103-115, 1989.

23. **Rago, R., Mitchen, J., and Wilding, G.** DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by freezing in distilled water. *Anal. Biochem.*, *191*: 31-34, 1990.

24. **Thompson, T.A., Gould, M.N., Burkholder, J.K., and Yang, N.-S.** Transient promoter activity in primary rat mammary epithelial cells evaluated using particle bombardment gene transfer. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* *29A*: 165-170, 1992.

25. **Veldscholte, J., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G.G., Jenster, G., Berrevoets, C., Claassen, E., van Rooij, H.C., Trapman, J., Brinkmann, A.O., and Mulder, E.** A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *173*: 534-540, 1990.

26. **Lieberman, R.** Androgen deprivation therapy for prostate cancer chemoprevention: current status and future directions for agent development. *Urol.*, *58 (S2A)*: 83-90, 2001.

27. **Nakamura, K., Yasunaga, Y., Segawa, T., Ko, D., Moul, J.W., Srivastava, S., and Rhim, J.S.** Curcumin down-regulates AR gene expression and activation in prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.*, *21*: 825-830, 2002.

28. **Le, H.T., Schaldach, CM., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F.** Plant-derived 3,3'-diindolylmethane is a strong androgen antagonist in human prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.*, *278*: 21136-21145, 2003.

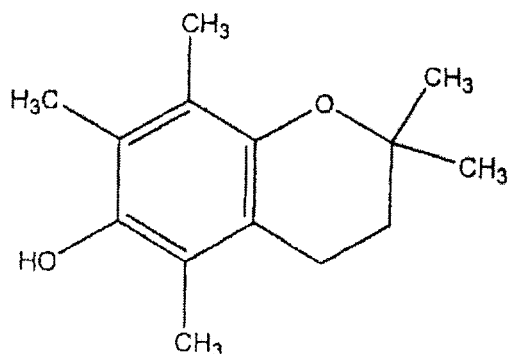
29. **Burton, GW, Cheeseman, KH, Doba, T, Ingold, KU, and Slater, TF.** Vitamin E as an antioxidant *in vitro* and *in vivo*. In: *Biology of Vitamin E: Ciba Foundation Symposium 101*, pp. 4-18. London: *Pitman*, 1983.

30. **Dimitrov, N.V., Meyer, C., Gilliland, D., Ruppenthal, M., Chenoweth, W., and Malone, W.** Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.*, *53*: 723-729, 1991.

31. **Traber, M.G., Elsner, A., and Brigelius-Flohe, R.** Synthetic as compared with natural vitamin E is preferentially excreted as α CEHC in human urine: studies using deuterated alpha-tocopheryl acetates. *FEBS Lett.*, *437*: 145-148, 1998.

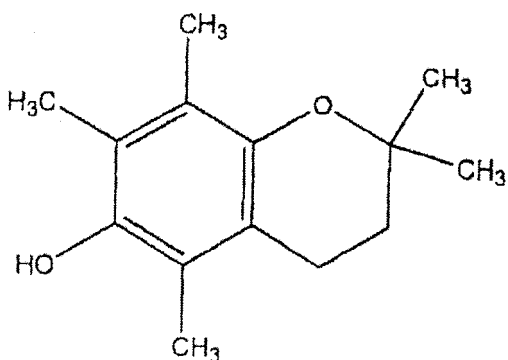
REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto que tiene la fórmula:



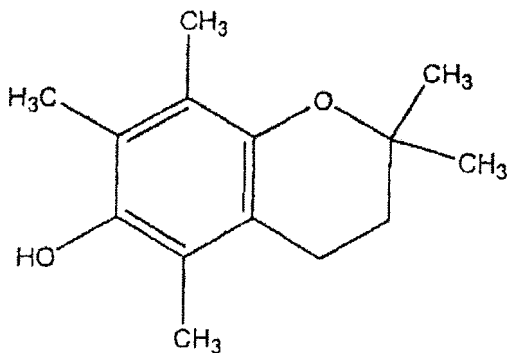
o una sal de dicho compuesto farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para retrasar la progresión del cáncer de próstata en un paciente que sufre de cáncer de próstata, o para prevenir la ocurrencia o recurrencia del cáncer de próstata en un paciente que tiene riesgo de padecerlo.

2. Uso de un compuesto que tiene fórmula:



o una sal de dicho compuesto farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un alimento funcional para retrasar la progresión del cáncer de próstata en un paciente que sufre de cáncer de próstata, o para prevenir la ocurrencia o recurrencia de cáncer de próstata en un paciente que tiene riesgo de padecerlo.

3. Una composición de alimento funcional para retrasar la progresión del cáncer de próstata en un paciente que sufre de cáncer de próstata, o para prevenir la ocurrencia o recurrencia del cáncer de próstata en un paciente que tiene riesgo de padecerlo, que comprende un artículo alimenticio o parte de un artículo alimenticio y un compuesto que tiene la fórmula:



o una sal de dicho compuesto farmacéuticamente aceptable; y un portador aceptable.

4. Una composición de alimento funcional según la reivindicación 3, en la que la composición comprende adicionalmente un agente que potencia el sistema inmune, un agente anti-inflamatorio, un agente anti-oxidante o una mezcla de ellos.

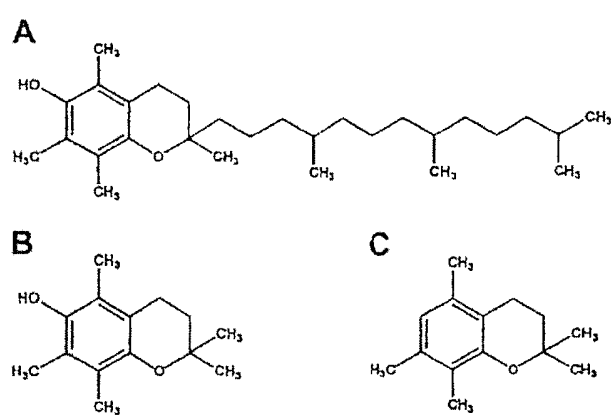


FIG. 1

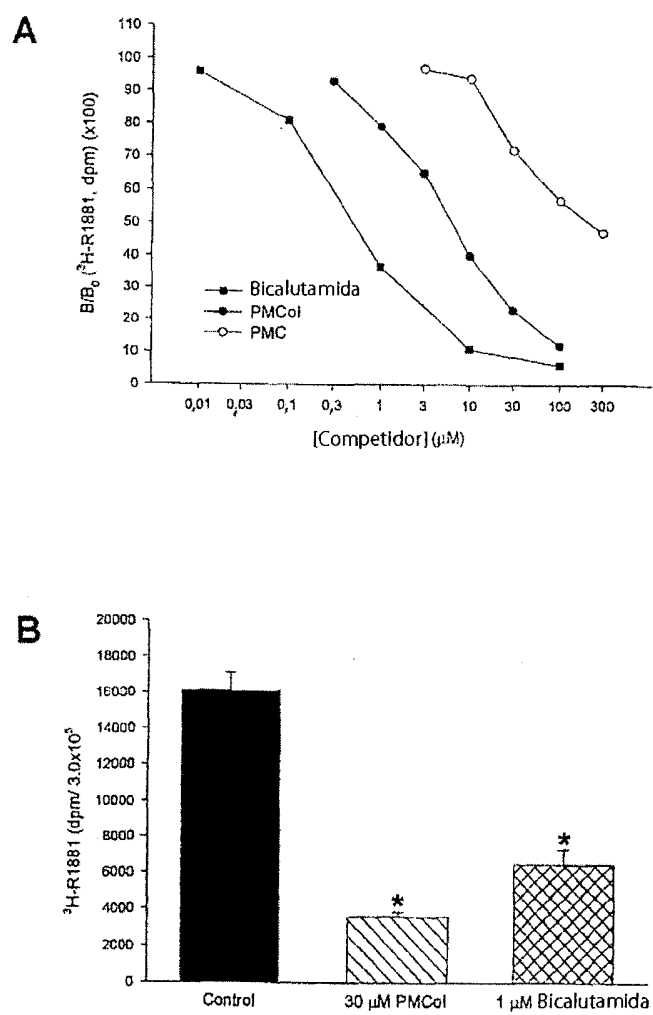


FIG. 2

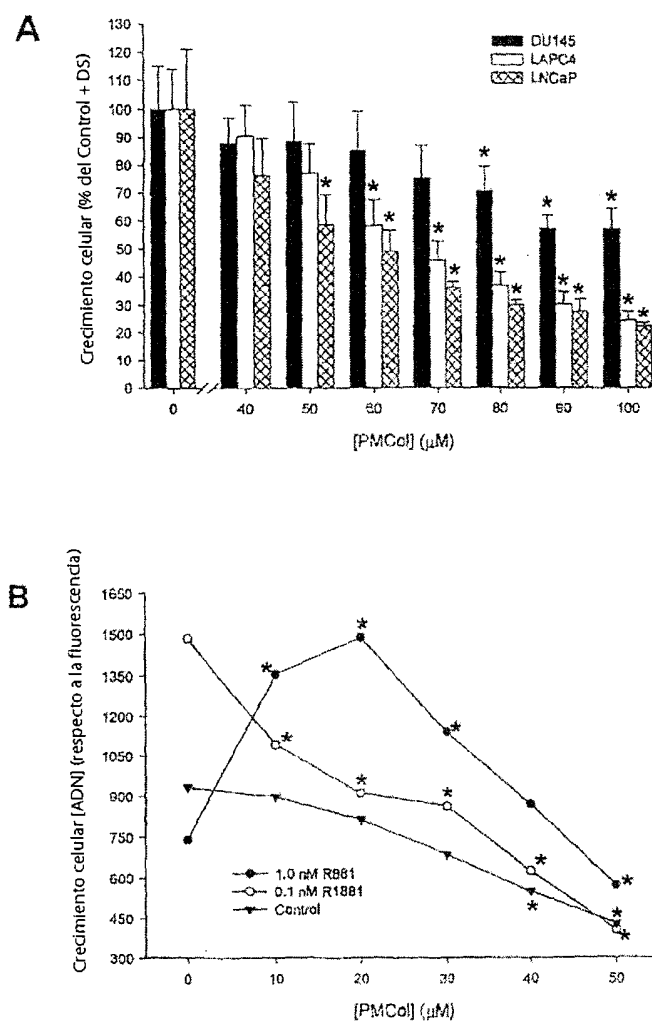


FIG. 3

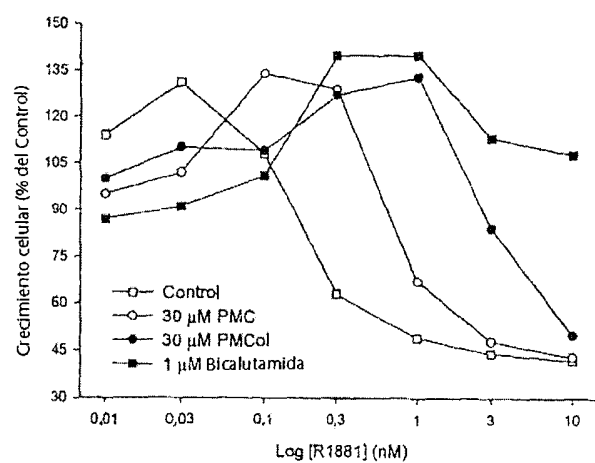


FIG. 4

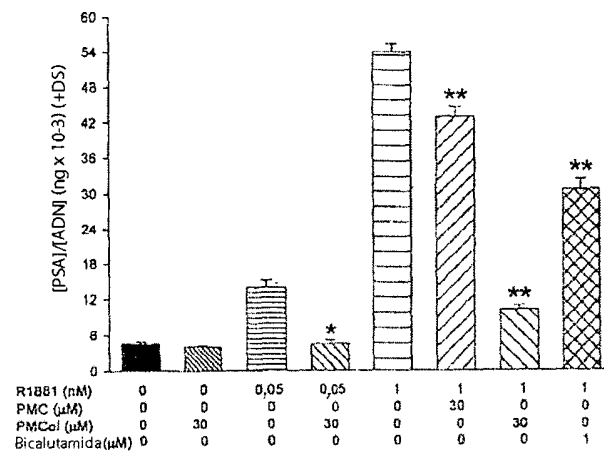


FIG. 5

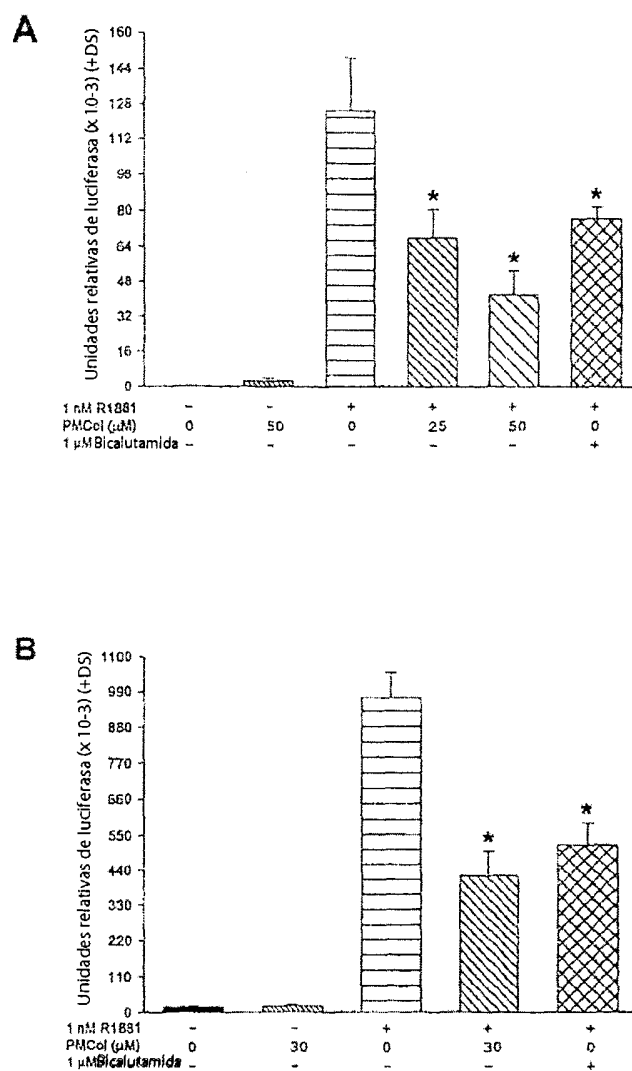


FIG. 6

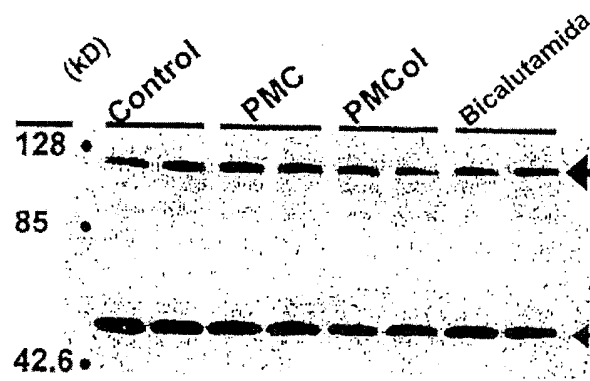


FIG. 7

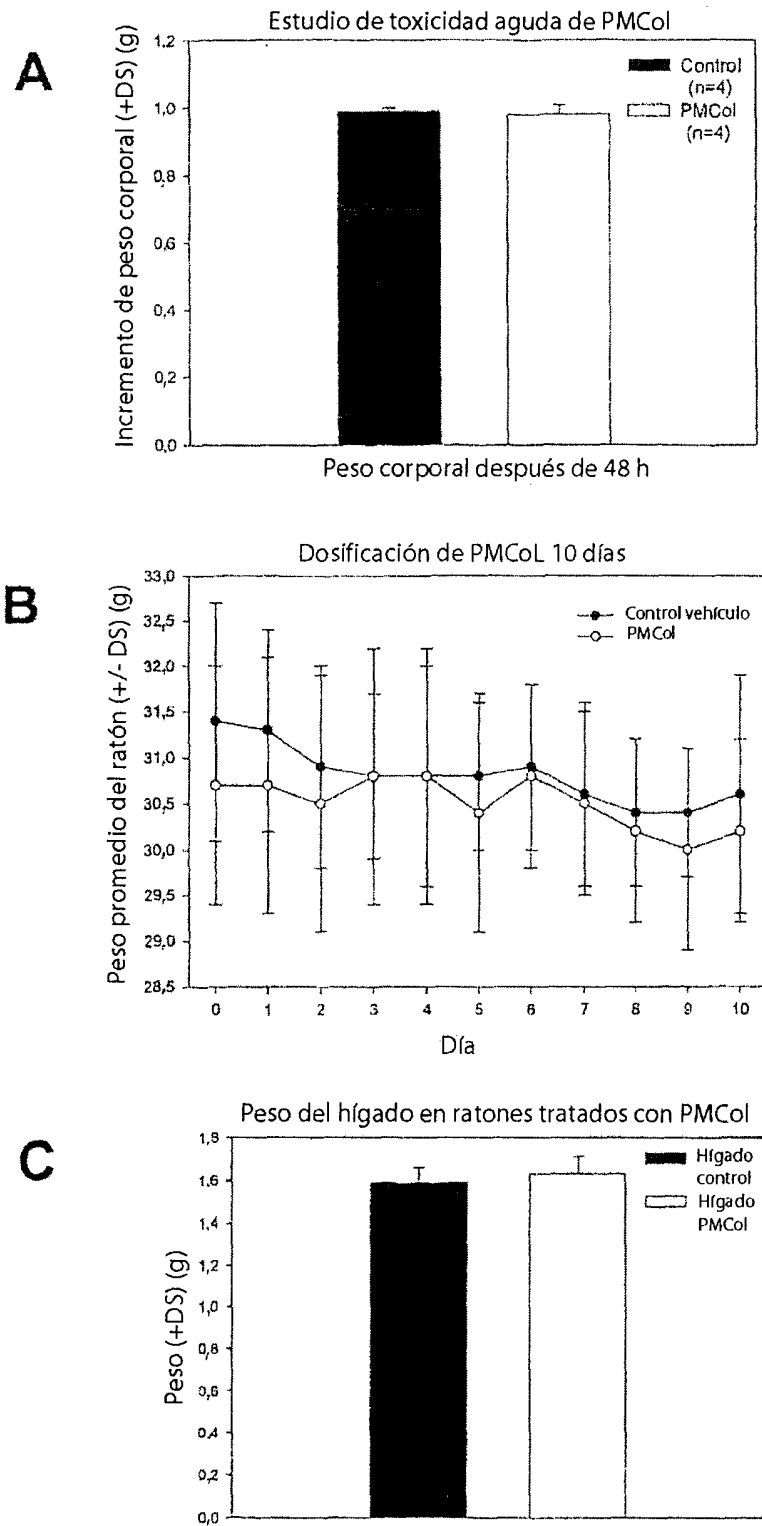


FIG. 8