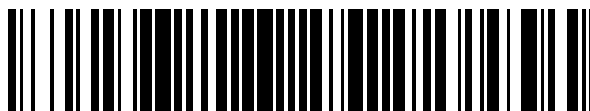


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 215**

51 Int. Cl.:
A61K 31/355 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04711839 .3**
96 Fecha de presentación: **17.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1593127**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.11.2005**

54 Título: **Protección contra la radiación mediante gamma tocotrienol, succinato de alfa-tocoferol o succinato de gamma-tocoferol**

30 Prioridad:
14.02.2003 US 447298 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.11.2012

73 Titular/es:
**HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE
ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE, INC.
(100.0%)
6720-A Rockledge Drive, Suite 100
Bethesda, MD 20817, US**

72 Inventor/es:
**KUMAR, K. SREE;
SRINIVASAN, VENKATARAMAN;
SEED, THOMAS M. y
PAPAS, ANDREAS**

74 Agente/Representante:
TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

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).

ES 2 391 215 T3

DESCRIPCIÓN

Protección contra la radiación mediante gamma tocotrienol, succinato de alfa-tocoferol o succinato de gamma-tocoferol

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a un método de uso de compuestos de tocotrienol y tocoferol como radioprotectores para la prevención y tratamiento de lesiones internas inducidas por radiación y mortalidad en mamíferos.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] La radiación ionizante es una radiación electromagnética o particulada capaz de producir pares de iones por interacción con materia. La radiación ionizante típica incluye rayos X, rayos gamma, partículas alfa, partículas beta (electrones), neutrones, y núcleos cargados. En los seres humanos, los riesgos excesivos inducidos por radiación van desde mortalidad a corto plazo (cuando la exposición es a dosis letales de radiación) hasta patologías a largo plazo incluyendo carcinogénesis (cuando la exposición es a niveles de radiación bajos durante un largo periodo de tiempo). La exposición a radiación ionizante dañina o letal puede ocurrir por una variedad de vías, tal como en la radiología terapéutica, accidentes de central de energía nuclear, disposición de materiales de residuos nucleares, exploraciones del espacio externo por astronautas, y el potencial uso de armas nucleares por terroristas o naciones beligerantes. Le exposición a muchas de estas situaciones son previsibles, y por lo tanto, las modalidades de prevención tienen un papel importante en la protección contra la radiación. Por ejemplo, la dosis de radiación que se utiliza para matar tejido tumoral en una radioterapia de cáncer está limitada ahora por la posible mortalidad de tejido normal asociada a dosis más altas. Las consecuencias de estas exposiciones dependen del grado de exposición a la radiación y puede variar desde la ausencia de cualquier efecto inmediato discernible hasta la mortalidad a largo y a corto plazo. Aunque no hayan efectos inmediatos discernibles o a corto plazo en casos de exposiciones a bajo nivel, los efectos se pueden expresar como patologías de aparición tardía como cáncer.

[0003] A pesar de que se ha llevado a cabo una investigación extensiva por ambos, a nivel del gobierno y del sector privado, sólo un reducido número de fármacos ha sido identificado como eficaz en la prevención de daños por radiación. Estos fármacos, no obstante, tienen todos efectos secundarios indeseables que han evitado su uso en seres humanos. De esta forma, todavía hay una necesidad de una composición que se pruebe como eficaz y segura en la prevención y tratamiento de daños por radiación en seres humanos.

[0004] En los últimos años, se ha reconocido que la presencia de radicales libres puede causar daños severos al cuerpo humano, dado que los radicales libres reaccionan con componentes celulares importantes, tales como ADN o la membrana celular, para disminuir o perjudicar funciones celulares fundamentales. Por ejemplo, están implicados radicales libres de oxígeno en muchas enfermedades incluyendo enfermedades neurodegenerativas (ELA, Parkinson, Alzheimer), cataractogénesis, aterosclerosis, diabetes mellitus, lesión de isquemia reperusión, kwashiorkor, y determinadas toxicidades, por mencionar sólo algunos.

[0005] Los radicales libres pueden ser neutralizados por antioxidantes. Uno de los antioxidantes proporcionados nutricionalmente es la vitamina E (α -tocoferol), una sustancia lipofílica oleaginosa que puede interrumpir o prevenir la propagación de radicales libres en sistemas biológicos. Dado que el daño por radiación está mediado por radicales libres inducidos por radiación, se ha usado la vitamina E para la protección de lesiones inducidas por radiación.

[0006] Por ejemplo, Weber y colaboradores [*Free Radical Biology & Medicine*, 22:761-769, (1997)] investigó la eficacia de tocoferoles y tocotrienoles aplicados tópicamente en la protección de piel murina de daño oxidante inducido por irradiación UV. En particular, una fracción de aceite de palma rica en tocotrienol (TRF) se aplicó a piel de ratón y el contenido de antioxidantes (es decir, α y γ tocoferol al igual que α y γ tocotrienol) se midió antes y después de la exposición a la luz ultravioleta. Weber descubrió que la aplicación previa del TRF a la piel de ratón dio como resultado la conservación de la vitamina E en la piel [Weber y colaboradores., *supra*, (1997)].

[0007] El documento de patente estadounidense n.º 5,376,361 también describe un método para la prevención y/o tratamiento de daños en la piel inducidos por la radiación. El método comprende la aplicación tópica de un tocotrienol o una preparación de vitamina E enriquecida con tocotrienol en la piel. No obstante, la vitamina E es menos eficaz como radioprotector cuando se usa internamente.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La presente invención se refiere a un método para la prevención y tratamiento de daños internos inducidos por radiación en un mamífero, comprendiendo el método la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz

de una composición farmacéutica comprendiendo al menos uno de γ -tocotrienol, succinato de α -tocoferol, y succinato de γ -tocotrienol. Un aspecto de la presente invención se refiere a métodos para evitar en un mamífero daños internos inducidos por radiación, tales como la supresión del sistema hematopoyético, por administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de γ -tocotrienol, succinato de α -tocoferol, y succinato de γ -tocotrienol.

[0009] Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para tratar a un mamífero que padece daños inducidos por radiación administrando al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de γ -tocotrienol, succinato de α -tocoferol, y succinato de γ -tocotrienol.

[0010] En una forma de realización, el γ -tocotrienol se inyecta a un mamífero subcutáneamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, o por vía intravascular para prevenir o tratar daños inducidos por radiación.

[0011] En otra forma de realización, succinato de α -tocoferol, y succinato de γ -tocotrienol o ambos se dan por administración oral a un mamífero para prevenir o tratar daños inducidos por radiación. El succinato de α -tocoferol, y succinato de γ -tocotrienol o ambos también pueden ser inyectados subcutáneamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, o por vía intravascular a un mamífero.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0012]

La figura 1 es una comparación de estructuras químicas entre γ -tocotrienol y α -tocoferol. La cadena lateral de γ -tocotrienol es insaturada y su anillo de fenilo tiene un grupo metilo adicional.

La figura 2 muestra radioprotección por γ -tocotrienol en dos experimentos diferentes. En el experimento 1, hubo una supervivencia del 100% en la exposición a 10.5 Gy tras la inyección de γ -tocotrienol mientras sólo un 12.5% de controles sobrevivieron. En el experimento 2, hubo un 75% de supervivencia en animales tratados con γ -tocotrienol y ninguno de los controles sobrevivieron.

La figura 3 es una comparación de las eficacias de protección de supervivencia de γ -tocotrienol con la de α -tocoferol, un análogo de γ -tocotrienol está a 10.5 Gy con 0.6 Gy por minuto. En dos experimentos, el γ -tocotrienol proporcionó 100% y 75% de protección de supervivencia de radiación, mientras que el α -tocoferol sólo proporcionó 75 y 50% respectivamente en estos dos experimentos.

La figura 4 es una comparación de eficacias de γ -tocotrienol y α -tocoferol con dosis de radiación más alta de 11 Gy. Con esta alta dosis de radiación incluso el α -tocoferol no fue eficaz, mientras que con γ -tocotrienol sobrevivieron el 40% de los animales.

La figura 5 muestra las eficacias de γ -tocotrienol y α -tocoferol en la prevención de pérdida de peso tras la irradiación. A los ratones se les dio α -tocoferol o tocotrienol s.c. y se irradiaron a 10.5 Gy con 0.6 Gy por minuto.

La figura 6 muestra el efecto de protección de succinato de α -tocoferol administrado por vía oral. La supervivencia de ratones irradiados tratados con 400 y 800 mg/kg, p.o., de tocotrienol 24 horas antes de la exposición a radiación 9, 9.5 y 10 Gy cobalt-60, con 0.6 Gy por minuto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0013] El objetivo principal de la presente invención es proporcionar métodos para la prevención de un mamífero que está en riesgo de mortalidad inducida por radiación. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un tratamiento de daños internos inducidos por radiación para un mamífero. El tercer objetivo de la presente invención es usar compuestos de tocotrienol para el fin específico de minimización de los efectos secundarios de la exposición a la radiación en el tejido no canceroso durante la radioterapia para el tratamiento de cáncer. Los efectos secundarios de la radioterapia pueden ser minimizados y/o la eficacia de la radioterapia se puede mejorar por la administración de compuestos de tocotrienol. La presente invención es particularmente útil para la prevención y/o el tratamiento de la supresión del sistema hematopoyético inducida por la radiación, al igual que otros daños.

[0014] Una forma de realización del presente método comprende la inyección a un mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de tocotrienol, o un derivado del mismo (de ahora en adelante se hace referencia a él colectivamente como "tocotrienol" para facilitar la referencia).

[0015] El término "tocotrienol" comprende homólogos de tocoferol (vitamina E) que soportan colas insaturadas, e incluyen, pero no se limitan a, α -, β -, γ -, y δ -tocotrienoles, desmetil-tocotrienol, didesmetil-tocotrienol (que se da en las semillas de girasol, aceites vegetales, cebada, granos de cerveza, avena, y violetas africanas), sus homólogos sintéticos, sus homólogos con anillos chroman metilados o dimetilados, y mezclas de los mismos. Los enlaces dobles pueden ser cis o trans o mezclas de los mismos. Como se ha descrito anteriormente, el término "tocotrienol" también abarca derivados de

tocotrienol.

[0016] En muchas formas de realización que utilizan tocotrienol en la composición, el tocotrienol está aislado de fuentes naturales. No obstante, también pueden ser empleadas preparaciones sintéticas al igual que mezclas de tocotrienol sintético y natural. Tocotrienoles útiles son productos naturales aislados de, por ejemplo, aceite de germen de trigo, salvado, o aceite de palma usando cromatografía líquida de alta resolución, o aislados por extracción de alcohol y/o destilación molecular de cebada, residuos de cerveza o avena. Como se utiliza en este caso, el término "tocotrienoles" incluye fracciones ricas en tocotrienol obtenidas de estos productos naturales al igual que los compuestos puros. Allí donde se usan derivados de tocotrienol, estos deben ser funcionalmente equivalentes al tocotrienol. Los derivados preferidos contienen ambos, el núcleo de cromanol y tres enlaces dobles en la cola de hidrocarburo.

[0017] Generalmente, el tocotrienol es inyectado subcutáneamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, o por vía intravascular.

[0018] En una forma de realización preferida de la invención, el tocotrienol es γ -tocotrienol o su derivado.

[0019] En otra forma de realización preferida de la presente invención, el tocotrienol se aplica mezclado con un portador farmacéuticamente aceptable para facilitar la absorción después de la inyección.

[0020] Los portadores farmacéuticos adecuados para uso inyectable incluyen soluciones estériles o dispersiones para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones estériles inyectables. En cualquier caso, la composición inyectable debería ser estéril y debería ser fluida en la medida en que exista una inyectabilidad fácil. Debe ser estable en las condiciones de producción y almacenamiento y debe ser conservada de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un medio solvente o de dispersión con, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante varios agentes antifúngicos y antibacterianos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede estar causada por inclusión en la composición de un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0021] Soluciones estériles inyectables se pueden preparar incorporando el compuesto activo (p. ej., tocotrienol o vitamina E enriquecida con tocotrienol) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un ligante estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente.

[0022] Otra forma de realización de la presente invención comprende la administración por vía oral a un mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de succinato de tocoferol o succinato de tocotrienol.

[0023] En una forma de realización preferida, el succinato de tocoferol es un succinato de α -tocoferol.

[0024] En otra forma de realización preferida, el succinato de tocotrienol es succinato de γ -tocotrienol.

[0025] En otra forma de realización preferida, el succinato de tocoferol o succinato de tocotrienol se administra en una composición oral.

[0026] Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden estar incluidas en cápsulas de gelatina o comprimidas en comprimidos. Para el propósito de la administración oral terapéutica, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usarse en forma de comprimidos, tabletas, o cápsulas. Las composiciones orales también pueden ser preparadas usando un portador fluido, donde el compuesto en el portador fluido es aplicado por vía oral y tragado. Agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden ser incluidos como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, tabletas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un ligante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente como almidón o lactosa, un agente de desintegración tal como ácido alginico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato o estearatos de magnesio; un excipiente tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, metilsalicilato, o aromatizante de naranja.

[0027] Otra forma de realización de la presente invención para la prevención o tratamiento de daños inducidos por radiación

comprende la administración a un mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de succinato de tocoferol o succinato de tocotrienol por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, o intravascular.

[0028] Es especialmente ventajoso formular composiciones en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se utiliza en este caso incluye unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a ser tratado; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en relación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención están dictadas por y son directamente dependientes de las únicas características del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a ser conseguido, y las limitaciones inherentes en la técnica de combinación de tal compuesto activo para el tratamiento de individuos.

[0029] La toxicidad y eficacia terapéutica de tales compuestos se puede determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar el LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y el ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y esto se puede expresar como la proporción LD50/ED50. Se prefieren compuestos que muestran índices terapéuticos grandes. Mientras que los compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos pueden ser utilizados, debería tenerse cuidado en el diseño de un sistema de entrega de tales compuestos a la zona de tejido afectado para minimizar daños potenciales en células no infectadas y, así, reducir efectos secundarios.

[0030] Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluye el ED50 con baja o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración de plasma circulante que incluye el IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que consigue una inhibición semi-máxima de síntomas) como se determina en el cultivo celular. Tal información puede utilizarse para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir niveles en plasma, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

[0031] Otro aspecto de la presente invención proporciona para ambos, métodos terapéuticos y profilácticos de tratamiento de un mamífero con riesgo de, susceptibilidad a o diagnosticado con daño de tejido asociado a la radiación. En una forma de realización, la invención proporciona un método para evitar daños internos asociados a la radiación en un mamífero, por la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica con tocoferol o tocotrienol. En otra forma de realización, la invención proporciona un método para tratar en un mamífero un daño interno asociado a la radiación, por administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica.

[0032] La cantidad eficaz de tocotrienol, tocoferol, succinato de tocotrienol o succinato de tocoferol necesaria para provocar la prevención y/o tratamiento terapéutico de daño inducido por radiación no está fijada per se. Una cantidad terapéuticamente eficaz es necesariamente dependiente de la identidad y forma del tocotrienol, tocoferol, succinato de tocotrienol o succinato de tocoferol empleado, la extensión de la protección necesitada, o la gravedad del daño por radiación a ser tratado.

[0033] La administración de la composición farmacéutica puede ocurrir antes de la exposición a la radiación, de manera que el daño interno asociado a la radiación es evitado o, alternativamente, retardado en su progresión. La dosis apropiada y vía de administración de la composición farmacéutica puede ser determinada basándose en el nivel de exposición a radiación o riesgo potencial de radiación.

[0034] Con respecto a ambos métodos de tratamiento profiláctico y terapéutico, tales tratamientos pueden ser confeccionados específicamente o modificados, basándose en conocimientos obtenidos del campo farmacogenómico. La "farmacogenómica," como se usa en este caso, incluye la aplicación de tecnologías genómicas tales como secuenciación genética, genética estadística, y análisis de expresión genética para fármacos en el desarrollo clínico y en el mercado. Más específicamente, el término se refiere al estudio de como los genes del sujeto determinan su respuesta a un fármaco (p. ej., un "fenotipo de respuesta a fármaco" o " fenotipo de respuesta a fármaco " del sujeto). De esta forma, otro aspecto de la invención proporciona métodos para confeccionar un tratamiento profiláctico o terapéutico del individuo con la composición farmacéutica según la respuesta al fármaco del individuo. La farmacogenómica permite a un facultativo o a un médico conseguir los tratamientos profilácticos o terapéuticos a los sujetos que más se benefician del tratamiento y evitar el tratamiento de sujetos que experimentarán efectos secundarios tóxicos relacionados con los fármacos.

[0035] Las diferencias en el metabolismo de la terapéutica puede llevar a toxicidad severa o fallo terapéutico por alterar la

relación entre dosis y concentración de sangre del fármaco farmacológicamente activo. Así, un médico o facultativo puede considerar la aplicación del conocimiento obtenido en estudios farmacogenómicos relevantes al determinar, por ejemplo, si administrar amifostina y vitamina E al igual que confeccionar la dosificación y/o el régimen terapéutico del tratamiento con amifostina y vitamina E.

[0036] La farmacogenómica trata con variaciones hereditarias clínicamente significativas en la respuesta a fármacos debido a disposición alterada de fármacos y acción anormal en personas afectadas. En general, se pueden diferenciar dos tipos de condiciones farmacogenéticas. Las condiciones genéticas transmitidas como factor único que altera la forma en la que actúan los fármacos en el cuerpo (acción de fármaco alterada) o condiciones genéticas transmitidas como factores únicos que alteran la forma en la que el cuerpo actúa con los fármacos (metabolismo de fármaco alterado). Estas condiciones farmacogenéticas pueden ocurrir bien como defectos genéticos raros o como polimorfismos naturales. Por ejemplo, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzimopatía común heredada en la que la complicación clínica principal es la hemólisis después de la ingestión de fármacos oxidantes (antimaláricos, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos) y consumo de alubias.

[0037] Un procedimiento farmacogenómico para identificar genes que predicen una respuesta al fármaco, conocido como "asociación amplia de genoma" depende en primer lugar de un mapa de alta resolución del genoma humano consistente en sitios relacionados de genes ya conocidos (por ejemplo, un mapa de marcador de gen "bi-alélico" que consiste en 60,000-100,000 sitios polimórficos o variables en el genoma humano, cada uno de los cuales tiene dos variantes). Un mapa genético de alta resolución de este tipo puede ser comparado con un mapa del genoma de cada uno de un número estadísticamente sustancial de temas participando en la fase II/III de la prueba de fármaco para identificar genes asociados con una respuesta de fármaco particular observada o efecto secundario. Alternativamente, un mapa de alta resolución de este tipo se puede generar a partir de una combinación de unos diez millones de polimorfismos únicos de nucleótido conocidos (SNPs) en el genoma humano. Como se utiliza en este caso, un "SNP" es una alteración común que ocurre en una base única de nucleótido en una extensión de ADN. Por ejemplo, un SNP puede ocurrir una vez por cada 1000 bases de ADN. Un SNP se puede ver implicado en un proceso de enfermedad. Por ejemplo, un SNP puede ocurrir una vez por cada 1000 bases de ADN. Un SNP puede verse implicado en un proceso de enfermedad. No obstante, la gran mayoría de SNPs puede no estar asociado a una enfermedad. Dado un mapa genético basado en la incidencia de tales SNPs, los individuos pueden ser reagrupados en categorías genéticas dependiendo de un modelo particular de SNPs en sus genomas individuales. De esta forma, los regímenes de tratamiento se pueden confeccionar en grupos de individuos genéticamente similares, teniendo en cuenta rasgos que pueden ser comunes entre tales individuos genéticamente similares.

[0038] Alternativamente, un método denominado "aproximación genética del candidato" se puede utilizar para identificar genes que predicen una respuesta a fármaco. Según este método, si se conoce un gen que codifica un fármaco objetivo, todas las variantes comunes de este gen pueden ser identificadas de forma suficientemente fácil en la población y se puede determinar si con una versión del gen versus otro está asociado con una respuesta particular de fármaco.

[0039] Como una forma de realización ilustrativa, la actividad de enzimas de metabolización de fármacos es un determinante importante de ambas, la intensidad y duración de la acción del fármaco. El descubrimiento de polimorfismos genéticos de enzimas de metabolización de fármaco (p. ej., N- acetiltransferasa 2 (NAT 2) y citocromo P450 enzimas CYP2D6 y CYP2C19) ha proporcionado una explicación en cuanto a por qué algunos sujetos no obtienen los efectos previstos del fármaco o muestran una respuesta exagerada al fármaco y toxicidad importante después de tomar la dosis estándar y segura de un fármaco. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos en la población, el metabolizador extensivo y metabolizador pobre. La prevalencia de fenotipos metabolizadores pobres es diferente entre diferentes poblaciones. Por ejemplo, el gen que codifica CYP2D6 es altamente polimórfico y se han identificado muchas mutaciones en metabolizadores pobres, que conducen todas a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizadores pobres de CYP2D6 y CYP2C19 experimentan con bastante frecuencia una respuesta a fármaco exagerada y efectos secundarios cuando reciben dosis estándar. Si un metabolito es la fracción terapéutica activa, los metabolizadores pobres no muestran respuesta terapéutica, como se demuestra para el efecto analgésico de la codeína mediado por su morfina de metabolito formada por CYP2D6. El otro extremo son los metabolizadores llamados ultra rápidos que no responden a dosis estándar. Recientemente, la base molecular de metabolismo ultra rápido ha sido identificada como debida a la amplificación genética CYP2D6.

[0040] Alternativamente, se puede utilizar un método denominado "perfilado de expresión genética" para identificar genes que predicen la respuesta del fármaco. Por ejemplo, la expresión genética de un animal al que se ha dosificado un fármaco (p. ej., expresión genética en respuesta a amifostina) puede dar una indicación sobre si las vías de gen relacionadas con la toxicidad han sido activadas.

[0041] La información generada por más de uno de los métodos farmacogenómicos anteriores puede utilizarse para determinar la dosificación apropiada y regímenes de tratamiento para tratamiento profiláctico o terapéutico de un individuo. Este conocimiento, cuando se aplica para la dosificación o selección de fármaco, puede evitar reacciones adversas o fallo terapéutico y mejorar así la eficiencia terapéutica o profiláctica cuando se trata a un sujeto con tocoferol o tocotrienol de

protección de radiación.

[0042] Las modificaciones de las composiciones y métodos de la invención descritos anteriormente, según técnicas estándar, será fácilmente aparente para un experto en la materia y estarán abarcadas por la invención.

[0043] La protección de mortalidad inducida por radiación mediante tocotrienol, succinato de tocoferol, y succinato de tocotrienol se demuestra en los siguientes ejemplos. Aunque los resultados se presentan aquí para el caso de ratones, el tocotrienol y el tocoferol han sido usados como un suplemento nutricional en barras de humanos, por lo tanto se puede aplicar directamente a escenarios humanos.

Ejemplo 1. Animales

[0044] Ratones masculinos CD2F1, de 6-8 semanas de edad (aproximadamente 25 g), obtenidos de Jackson Labs se utilizaron en todo este estudio y fueron mantenidos en habitaciones mantenidas a $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Los animales se mantuvieron en cuarentena a su llegada durante 10 días durante los cuales se hicieron pruebas serológicas en busca de contaminación por patógenos. Se proporcionó a todos los animales dieta granulada y agua *ad lib*.

Ejemplo 2. Preparación de γ -tocotrienol

[0045] Se realizó una preparación de γ -tocotrienol con un volumen final de 1 ml mezclando 0.11 ml de γ -tocotrienol con 0,85 ml de PEG-400 (polietilenglicol-400) y 0.05 ml de placebo-E-vital, un agente de solubilización (Schering-Plough). 1 ml de la preparación es suficiente para 8 ratones. La concentración final de γ -tocotrienol es de 100 mg/ml. El vehículo para la inyección en animales de control se preparó exactamente como para γ -tocotrienol excepto que se usaron 0.11 ml de aceite de oliva en vez de γ -tocotrienol.

Ejemplo 3. Inyección de animales y radiación

[0046] Se inyectó a cada animal subcutáneamente (en la nuca) 0.1 ml de bien γ -tocotrienol o preparación de vehículo. Las inyecciones se realizaron de 20-24 horas antes de la irradiación.

[0047] Los animales se colocaron en cajas Lucite bien ventiladas (8 animales en una caja compartimentada) y se irradiaron en un dispositivo Cobalt-60 con una dosis de radiación de 0.6 Gy/min hasta una dosis total de radiación de 10.5 y 11 Gy. La dosis de radiación usada es una dosis super letal. La dosis de radiación LD50/30 para esta cepa de ratones es 8.9 Gy sólo con el vehículo. La dosis de radiación e índice de dosis fueron las mismas que se usaron para estudios de α -tocoferol.

Ejemplo 4. Control de la eficacia de γ -tocotrienol

[0048] Tras la radiación, los ratones fueron devueltos a sus jaulas originales con libre acceso a alimento y agua. Los ratones fueron pesados y controlados en busca de supervivientes cada día durante 30 días. El porcentaje de supervivientes tras los 30 días se usa como medida de la eficacia del γ -tocotrienol en la protección de daños por radiación.

Ejemplo 5. Eficacia de γ -tocotrienol como radioprotector

[0049] Se hicieron dos experimentos con ocho animales en cada experimento. Como se muestra en la figura 2, en el experimento 1, el 100% de los animales, que fueron tratados con γ -tocotrienol sobrevivieron a radiación 10.5 Gy, pero sólo el 12.5% de los animales tratados con el vehículo sobrevivieron. En el experimento 2, el 75% de los animales tratados con γ -tocotrienol fueron protegidos de mortalidad por radiación y hubieron supervivientes en el grupo tratado con el vehículo.

Ejemplo 6. Comparación de la eficacia de γ -tocotrienol con α -tocoferol

[0050] Las eficacias de los dos isómeros fueron comparadas y los resultados se muestran en la figura 3. Se utilizó una dosis de radiación de 10.5 Gy en ambos casos y se realizaron dos experimentos con 8 ratones en cada experimento. La protección por γ -tocotrienol fue consistentemente más alta por 25% en ambos experimentos. El γ -tocotrienol protegió 100% y 75% y el α -tocoferol proporcionó 75% y 50% de protección respectivamente. El vehículo no tuvo ningún efecto o sólo un efecto muy pequeño.

Ejemplo 7. Eficacia de protección de γ -tocotrienol con una dosis de radiación más alta

[0051] Dado que ambos α -tocoferol y γ -tocotrienol protegieron a 10.5 Gy, se utilizó una dosis de radiación superior de 11 Gy para distinguir entre las eficacias de protección de estos dos isómeros. La figura 4 compara las eficacias con una dosis de

radiación de 11 Gy y muestra que el γ -tocotrienol es un radioprotector mejor que α -tocoferol incluso con una dosis de radiación tan alta.

[0052] Cuando los animales (ratones) están expuestos a 8.5 Gy de radiación de cobalto, aproximadamente el 50% de los animales mueren en 30 días. Cuando se aumenta la dosis de radiación a 10.5 Gy bien no hay supervivientes o sólo unos pocos supervivientes (menos del 15%). No obstante, cuando a los animales se les da γ -tocotrienol antes de la irradiación, el 75%-100% de los animales sobreviven. La protección del compuesto parental, α -tocoferol sólo fue un 25% inferior a la de γ -tocotrienol. Cuando la dosis de radiación se elevó adicionalmente a 11 Gy, no hubieron supervivientes incluso con α -tocoferol, pero el 40% de los animales tratados con γ -tocotrienol sobrevivieron. De este modo el uso de γ -tocotrienol puede aumentar el número de supervivientes de una exposición nuclear.

Ejemplo 8. El tratamiento de γ -tocotrienol restaura la pérdida de peso corporal después de la radiación

[0053] Como se muestra en la figura 5, los ratones irradiados con 10.5 Gy perdieron peso en los cuatro primeros días después de la irradiación, y luego, comenzaron a ganar peso entre los días 4 y 6. Entre los diferentes grupos de tratamiento, los ratones no tratados (sin tratamiento; irradiación) y los ratones tratados con vehículo (*Vehicle*) comenzaron a perder peso nuevamente alrededor del día 9 y murieron el día 15. En cambio, los ratones tratados con vitamina E o tocotrienol continuaron ganando peso y no murieron a causa de la irradiación. Debe tenerse en cuenta, no obstante, que los ratones tratados con vitamina E experimentaron otro periodo de pérdida de peso entre los días 10 y 20.

Ejemplo 9. Preparación de succinato de α -tocoferol (TS)

[0054] 0.5 g de TS (Sigma, 1210 unidades/g) fueron sonicados con 2,85 ml de PEG-400 (polietilenglicol-400) y 0,15 ml de placebo-E-vital, un agente de solubilización (Schering-Plough). La concentración final de TS en la solución preparada es de 200 unidades/ml. Con una dosis de 800 unidades/kg, es suficiente como se ha descrito anteriormente 1 ml de la solución para 8 ratones. El vehículo para la inyección en los ratones de control se preparó exactamente como el TS excepto que se utilizaron 0.5 ml de aceite de oliva en vez de TS.

Ejemplo 10. Administración oral de succinato de α -tocoferol y radiación

[0055] Se administró a cada animal por vía oral 0.1 ml de solución TS (200 unidades/ml) o de vehículo usando agujas de administración con una cabeza engrosada. Todas las administraciones se hicieron de 20-24 horas antes de la irradiación.

[0056] Los animales se colocaron entonces en cajas Lucite bien ventiladas (ocho animales en una caja compartimentada) y se irradiaron en una instalación Cobalt-60 con un índice de dosis de radiación de 0.6 Gy/min para dosis de radiación total de 9, 9.5, y 10 Gy. Las dosis de radiación usadas de 9.5 y 10 Gy son dosis letales. La dosis de radiación LD 50/30 para esta cepa de animales es de 8.9 Gy con el vehículo sólo.

Ejemplo 11. Protección contra la radiación por succinato de α -tocoferol

[0057] La eficacia de succinato de α -tocoferol a la hora de proteger contra la radiación se controla como se describe en el ejemplo 4. La figura 6 muestra que una dosis de radiación de 9.5 Gy mata a todos los animales de control. No obstante, el 60% de los ratones tratados con succinato de α -tocoferol sobrevivieron a la misma dosis de exposición a radiación.

Ejemplo 12. Protección contra la radiación por succinato de γ -tocotrienol

[0058] El succinato de γ -tocotrienol se puede sintetizar por derivatización y prepararse como se describe en el ejemplo 9 para la administración oral. El efecto de succinato de γ -tocotrienol administrado por vía oral en la protección contra la radiación se puede evaluar como se describe en los ejemplos 10 y 4. Se anticipa que el succinato de γ -tocotrienol sería un 40-50% más eficaz que succinato de α -tocoferol (es decir, incrementa el índice de supervivencia en 40-50% en las mismas condiciones experimentales), basándose en la eficacia mejorada de γ -tocotrienol en comparación con α -tocoferol.

[0059] La descripción anterior tiene el objetivo de enseñar a la persona experta en la materia como poner en práctica la presente invención, y no pretende detallar todas aquellas modificaciones y variaciones obvias de ésta, que serán aparentes para el trabajador experto al leer la descripción. Se pretende, no obstante, que todas estas modificaciones y variaciones obvias se incluyan en el campo de la presente invención, que se define por las siguientes reivindicaciones. Las reivindicaciones pretenden cubrir los componentes y pasos reivindicados en cualquier secuencia que sea eficaz para hacer frente a los objetivos pretendidos, a menos que el contexto indique específicamente lo contrario.

REIVINDICACIONES

1. Método para la prevención y tratamiento de daños internos inducidos por la radiación en un mamífero, comprendiendo dicho método:
5 administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica comprendiendo al menos uno de γ -tocotrienol, succinato de α -tocoferol, y succinato de γ -tocotrienol.
2. Método según la reivindicación 1, donde dicha composición farmacéutica comprende un portador farmacéuticamente aceptable.
10
3. Método según la reivindicación 1, donde dicha composición farmacéutica comprende γ -tocotrienol.
4. Método según la reivindicación 3, donde dicha composición farmacéutica es administrada subcutáneamente.
15
5. Método según la reivindicación 3, donde dicha composición farmacéutica es administrada intramuscularmente.
6. Método según la reivindicación 3, donde dicha composición farmacéutica es administrada intraperitonealmente.
- 20 7. Método según la reivindicación 3, donde dicha composición farmacéutica se administra por vía intravascular.
8. Método según la reivindicación 1, donde dicha composición farmacéutica comprende succinato de α -tocoferol.
9. Método según la reivindicación 8, donde dicha composición farmacéutica es administrada por vía oral.
25
10. Método según la reivindicación 1, donde dicha composición farmacéutica comprende succinato de γ -tocotrienol.
11. Método según la reivindicación 10, donde dicha composición farmacéutica es administrada por vía oral.
- 30 12. Método según la reivindicación 1, donde dicha composición farmacéutica comprende succinato de α -tocoferol, y succinato de γ -tocotrienol.
13. Método según la reivindicación 12, donde dicha composición farmacéutica es administrada por vía oral.
- 35 14. Método según la reivindicación 12, donde dicha composición farmacéutica es administrada subcutáneamente.
15. Método según la reivindicación 12, donde dicha composición farmacéutica es administrada intramuscularmente.
16. Método según la reivindicación 12, donde dicha composición farmacéutica es administrada intraperitonealmente.
40
17. Método según la reivindicación 12, donde dicha composición farmacéutica se administra por vía intravascular.
18. Método según la reivindicación 1, donde dicho daño interno inducido por radiación está provocado por supresión inducida de radiación del sistema hematopoyético.
45
19. Composición farmacéutica para la prevención y tratamiento de daño interno inducido por radiación en un mamífero, comprendiendo:
50 al menos uno de succinato de α -tocoferol y succinato de γ -tocotrienol; y
 un portador farmacéuticamente aceptable,

donde dicha composición farmacéutica se formula para administración oral.
20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19, donde dicha composición farmacéutica comprende además un agente de solubilización.
55
21. Método para minimizar un efecto secundario de exposición a radiación en tejido no canceroso durante la radioterapia para tratamientos del cáncer comprendiendo:
60 administración a un sujeto con la necesidad de tal tratamiento de una composición farmacéutica comprendiente al menos uno de gamma tocotrienol, succinato de alfa tocoferol o succinato de gamma tocoferol.

22. Método según la reivindicación 21, donde dicho efecto secundario es la supresión del sistema hematopoyético inducida por la radiación.

FIG. 1

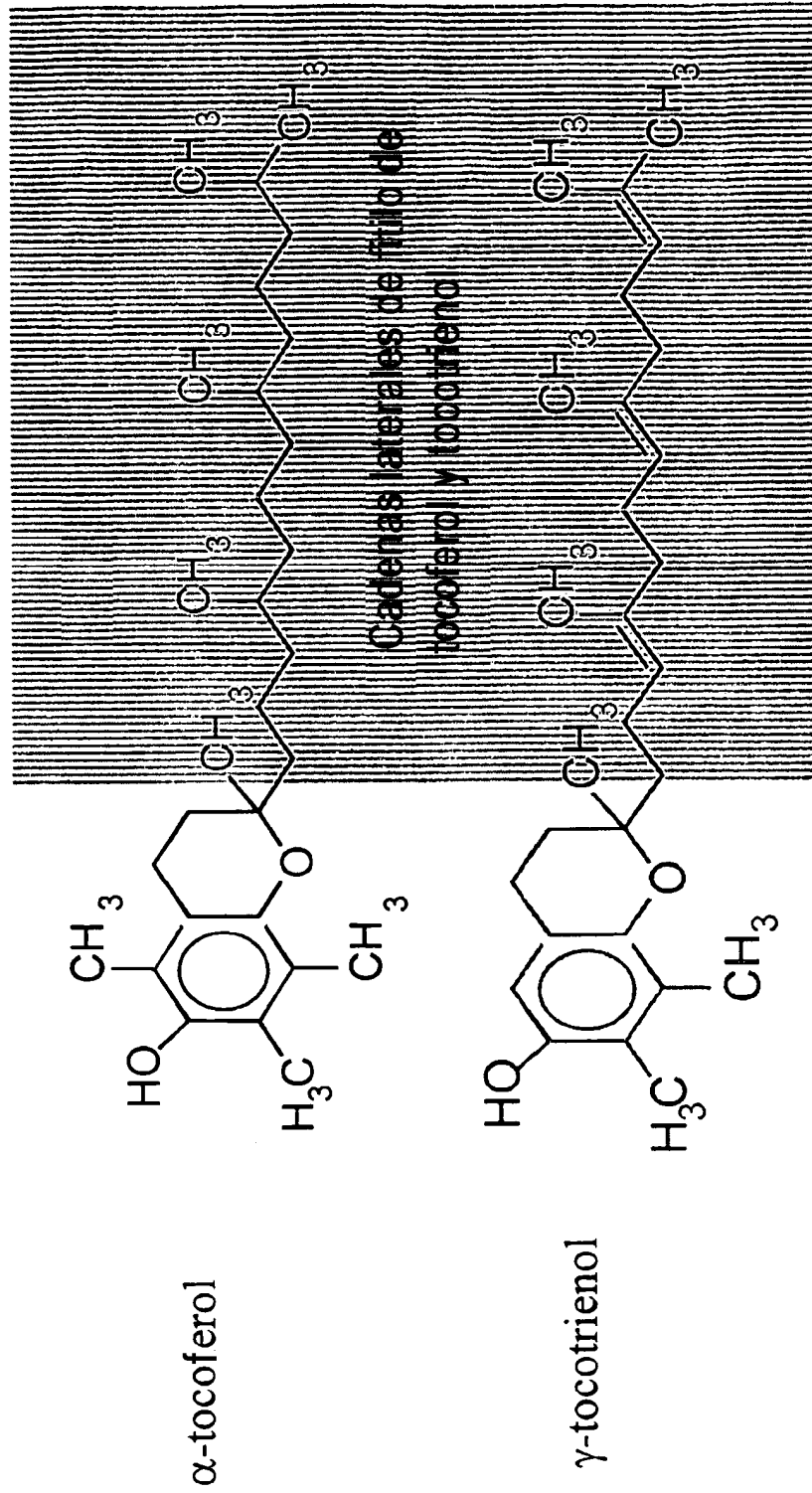


FIG. 2

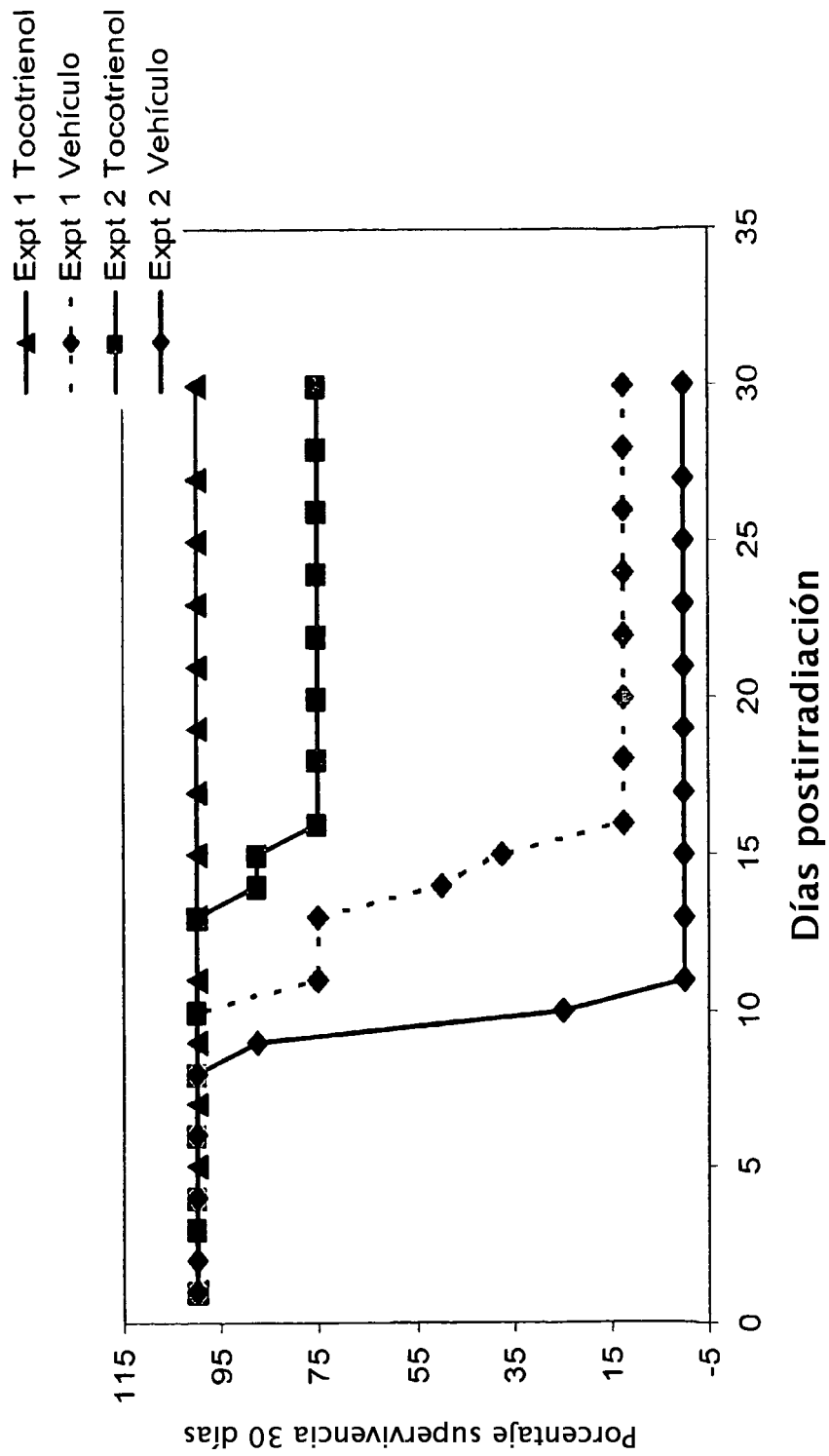


FIG. 3

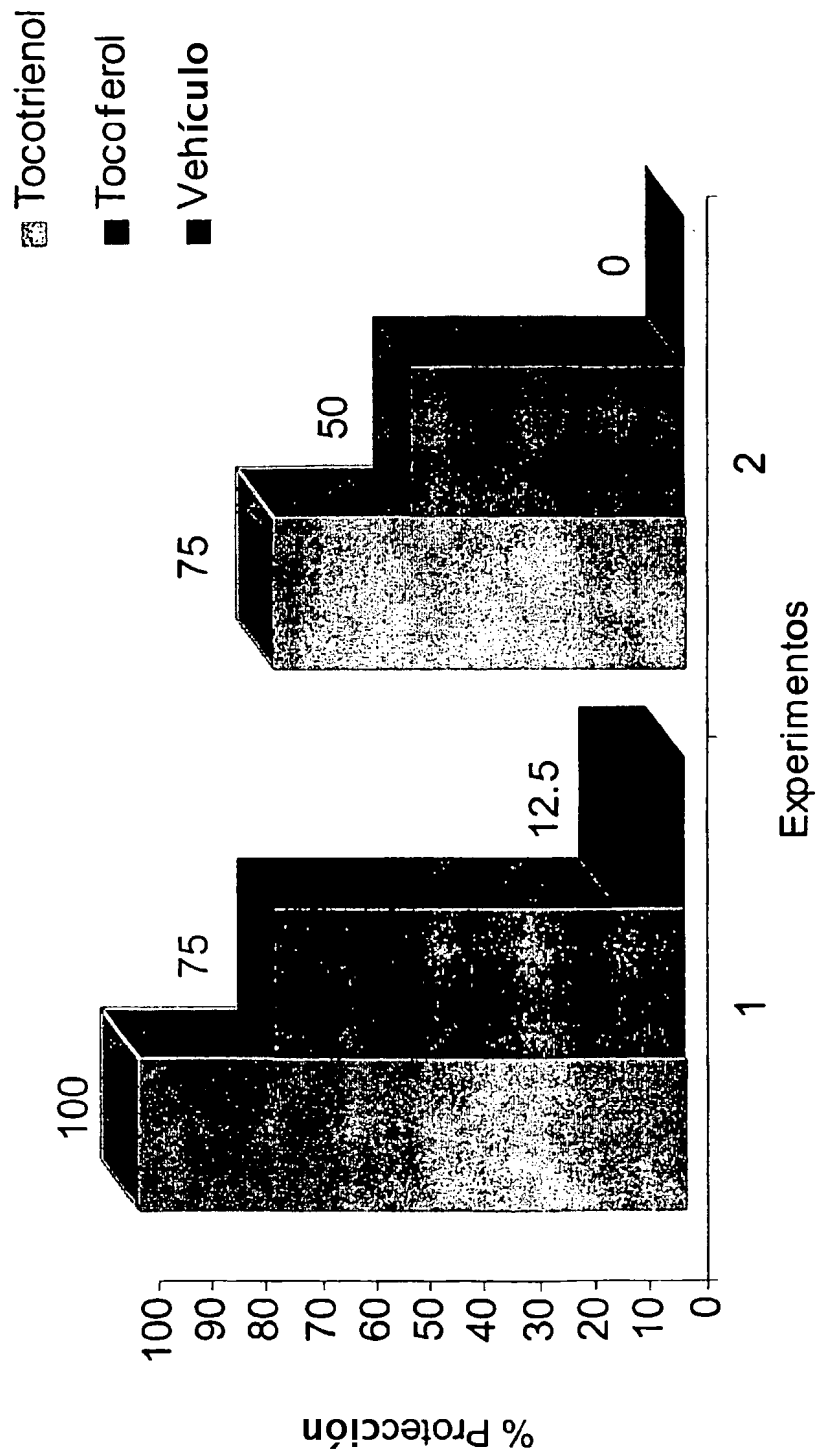


FIG. 4

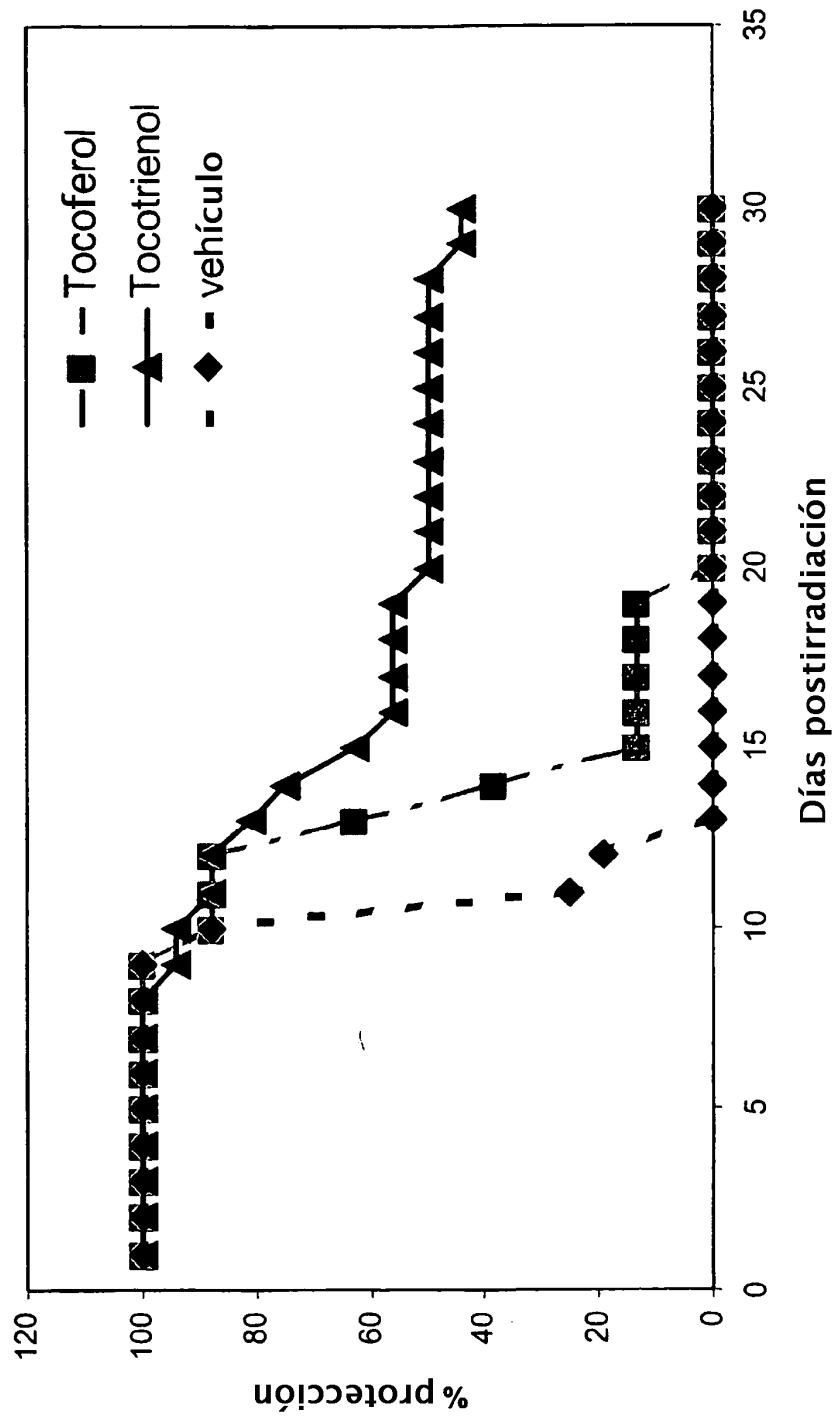


FIG. 5

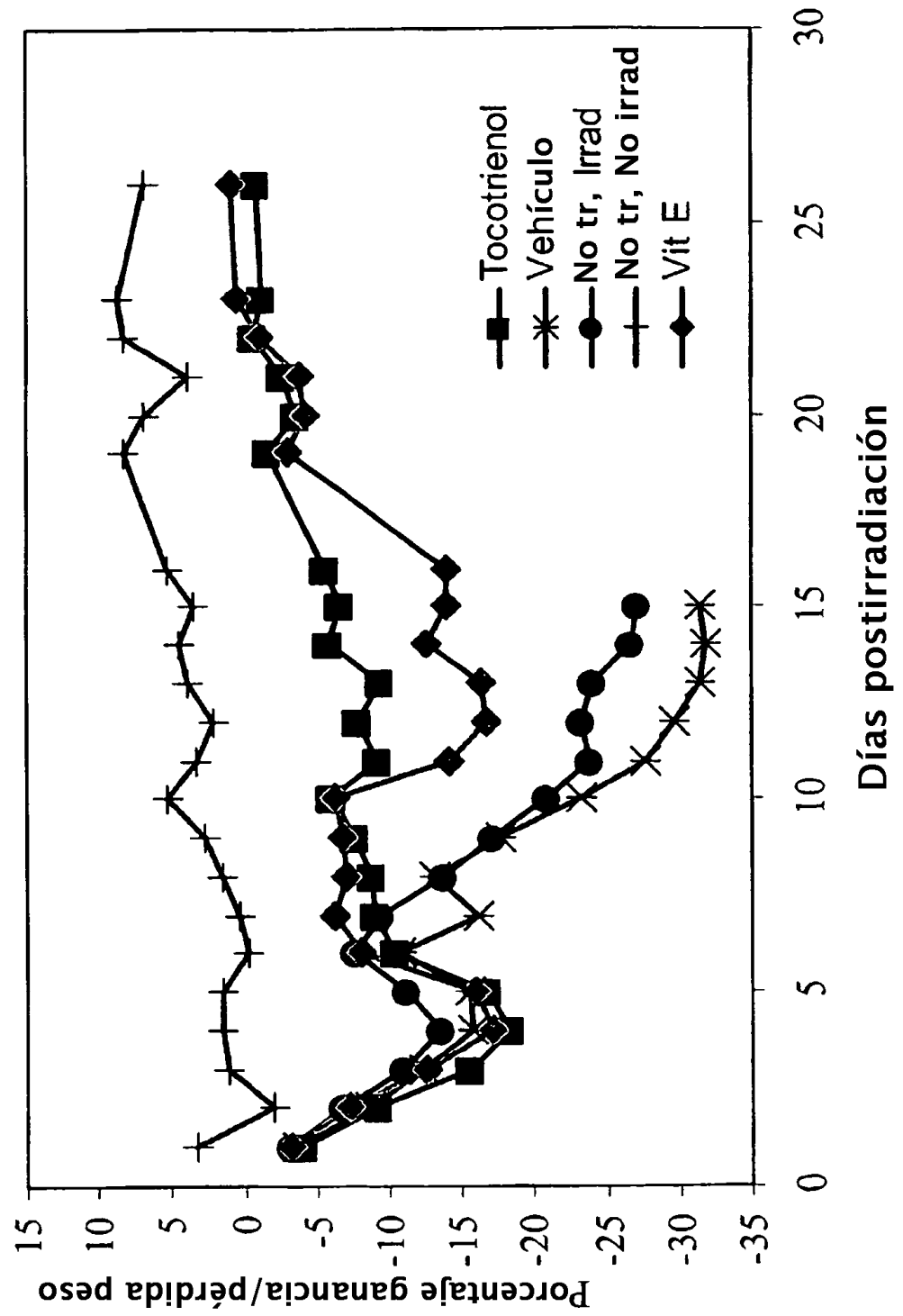


FIG. 6

