

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 357**

51 Int. Cl.:

C07C 211/09 (2006.01)

A61K 31/132 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2007** **E 07776756 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012** **EP 2026782**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de N1,N4-bis(buta-1,3-dienil)butano-1,4-diamina y usos de las mismas**

30 Prioridad:

03.05.2006 US 797142 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2013

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
614 WALNUT STREET, P.O. BOX 7365
MADISON, WI 53707-7365, US**

72 Inventor/es:

**BASU, HIRAK, S.;
CHURCH, DAWN, R.;
WOSTER, PATRICK, M. y
WILDING, GEORGE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 399 357 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas de N1,N4-bis(buta-1,3-dienil)butano-1,4-diamina y usos de las mismas.

Antecedentes de la invención

El cáncer de próstata metastásico resistente al tratamiento hormonal avanzado es la segunda causa principal de muertes por cáncer entre hombres que viven en los EE.UU. Se determina que en 2006, más de 27.000 hombres estadounidenses morirán de cáncer de próstata metastásico. Actualmente, la mayoría de agentes quimioterápicos usados en clínicas están limitados en el tratamiento de la enfermedad. Por tanto, existe una necesidad sustancial de nuevos agentes terapéuticos para tratar cáncer de próstata metastásico.

En el momento del diagnóstico inicial, la mayoría de los pacientes con cáncer de próstata tienen tumores dependientes de andrógenos que remiten rápidamente después de la cirugía, radiación y terapia de privación de andrógenos. Sin embargo, el cáncer presenta recidiva unos cuantos años después en un porcentaje considerable de tales pacientes. La recidiva se pone de manifiesto en forma de enfermedad metastásica resistente al tratamiento hormonal avanzada. Actualmente, no existe ninguna terapia eficaz para tratar o prevenir esta enfermedad, particularmente en un estado avanzado. Como tal, existe una necesidad sustancialmente urgente de desarrollar fármacos para reducir la recidiva y progresión del cáncer de próstata.

Se ha planteado la teoría de que el estrés oxidativo en tejido de próstata es un factor contribuyente principal para la aparición y progresión de cáncer de próstata. Por tanto, existe además una necesidad urgente de descubrir y desarrollar fármacos que reduzcan terapéuticamente el estrés oxidativo.

Evidencias bioquímicas y epidemiológicas publicadas sugieren que el estrés oxidativo en tejido de próstata es uno de los factores contribuyentes principales para la aparición y progresión de cáncer de próstata y que los antioxidantes pueden reducir la carcinogénesis de próstata. Se sabe además que el andrógeno es uno de los inductores principales de ROS en células de próstata normales y malignas. (Véase Wilding, G., *Endocrine Control of Prostate, Cancer, Cancer Surveys*, 23:43-62 (1995)). También se sabe que dentro de la ruta catabólica de poliaminas, la recirculación de la enzima acetil-poliamina oxidasa ("APAO") es una fuente principal de producción de ROS. (Véanse Cohen, S.S., *A Guide to the Polyamines*, Oxford Univ. Press, Oxford UK: 296-319 (1998); Schwartz, B *et al*, A New Model for Disruption of the Ornithine Decarboxylase Gene, SPE1, In *Saccharomyces Cerevisiae Exhibits Growth Arrest and Genetic Instability at the MAT Locus*, *Biochem J.*, 15 de nov.:312 (Pt. 1):83-90 (1995); Schipper RG *et al*, Antitumor Activity of the Polyamine Analog N(1),N(11)-diethylnorspermine Against Human Prostate Carcinoma Cells, *The Prostate*, 44(4):313-21 (2000); Casero, RA *et al*, The Role of Polyamine Catabolism in Anti-tumour Drug Response, *Biochem. Soc. Trans.*, abril: 31(2):361-5 (2003); Ha, HC *et al*, The Role of Polyamine Catabolism in Polyamine Analogue-Induced Programmed Cell Death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(21):11557-62 (1997); y Bey, P *et al*, N-2,3-Butadienyl-1,4-butanediamine Derivatives: Potent Irreversible Inactivators of Mammalian Polyamine Oxidase, *J. Med. Chem*, 28(1):1-2 (1985)).

Sumario de la invención

Un aspecto de la invención es un compuesto que es N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina o una sal o solvato de la misma para su uso en el tratamiento de cáncer inhibiendo la acetil-poliamina oxidasa en la próstata de un ser humano masculino. En una realización a modo de ejemplo, la acetil-poliamina oxidasa se inhibe en al menos el 50% en comparación con un ser humano masculino no tratado.

Otro aspecto de la invención es N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento profiláctico de cáncer de la próstata en un ser humano masculino.

En una realización a modo de ejemplo del método anterior, el compuesto se usa en una cantidad terapéutica que es una cantidad suficiente para prevenir o reducir la aparición y/o recidiva de cáncer de próstata en comparación con un control de ser humano masculino no tratado con o sin diagnóstico previo de cáncer de próstata.

Otro aspecto de la invención es el compuesto para su uso en el tratamiento de cáncer en la próstata de un ser humano masculino.

En una realización a modo de ejemplo del método anterior, el compuesto se usa en una cantidad terapéutica que es una cantidad suficiente para detener o reducir la progresión, morbilidad y/o mortalidad debida a cáncer de próstata.

En una realización a modo de ejemplo de cualquiera de los métodos anteriores, la sal es un acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, diclorhidrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, mitrato, pamoato, pantotenato, fosfato, difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teoclat o trietioduro.

En otra realización a modo de ejemplo de cualquiera de los métodos anteriores, la sal es una sal de diclorhidrato.

En otra realización a modo de ejemplo de cualquiera de los métodos anteriores, la cantidad terapéutica está en el intervalo de aproximadamente 1-100 mg/kg_{PC}, y la cantidad terapéutica se administra en dosis en el intervalo de bisemanal a diariamente.

- 5 En otra realización a modo de ejemplo de cualquiera de los métodos anteriores, la cantidad terapéutica está en el intervalo de aproximadamente 10-40 mg/kg_{PC}, y la cantidad terapéutica se administra en dosis semanalmente.

En otra realización a modo de ejemplo de cualquiera de los métodos anteriores, la cantidad terapéutica es de aproximadamente 25 mg/kg_{PC}, y la cantidad terapéutica se administra en dosis bisemanalmente.

- 10 En una realización a modo de ejemplo de la composición farmacéutica oral, la sal es un acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, diclorhidrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato, pantotenato, fosfato, difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teocato o trietioduro.

En una realización a modo de ejemplo de la composición farmacéutica oral, la composición está en forma de un comprimido no recubierto, comprimido recubierto, cápsula de gelatina dura, cápsula de gelatina blanda, polvo, cápsula, gragea, disolución, suspensión, elixir o emulsión.

- 20 Otro aspecto de la invención es un método de determinación de estrés oxidativo en tejido humano que comprende la etapa o la acción de medir *ex vivo* una razón de fluorescencia de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína oxidado:fluorescencia de ADN.

Otro aspecto de la invención es un método de determinación de estrés oxidativo en tejido humano que comprende la etapa o la acción de medir *ex vivo* una razón de fluorescencia de hidroetidina oxidada:fluorescencia de ADN.

- 25 Otro aspecto de la invención es un método de determinación de estrés oxidativo en tejido de próstata de ser humano masculino que comprende la etapa o la acción de medir una razón de fluorescencia de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína oxidado:fluorescencia de ADN *in vivo*.

En una realización a modo de ejemplo de los métodos anteriores, el tejido humano es tejido de próstata de ser humano masculino derivado de una biopsia de tumor.

- 30 En otra realización a modo de ejemplo de los métodos anteriores, el tejido humano se toma de una biopsia de tumor de una parte del cuerpo distinta a la próstata.

Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento de cáncer en la próstata de un perro macho que comprende la etapa o la acción de administrar una cantidad terapéutica de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma al perro.

- 35 Otro aspecto de la invención es un método de reducción de la concentración de especies reactivas del oxígeno en tejido humano que comprende la etapa o la acción de administrar una cantidad terapéutica de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma al ser humano.

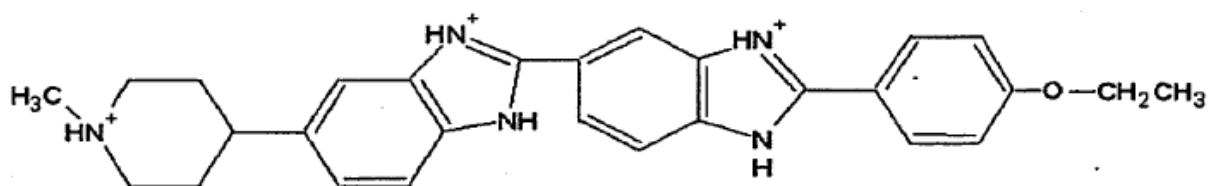
En una realización a modo de ejemplo del método anterior, la cantidad terapéutica es una cantidad suficiente para disminuir la concentración de una o más especies reactivas del oxígeno en la próstata en al menos el 50% en comparación con la concentración de especies reactivas del oxígeno en tejido humano no tratado.

- 40 En una realización a modo de ejemplo del método anterior, las especies reactivas del oxígeno son una o más de peróxido de hidrógeno, superóxido, radical hidroxilo y óxido nítrico.

Otro aspecto de la invención es un kit de reactivos para medir la concentración de especies reactivas del oxígeno *ex vivo* o *in vivo* en una biopsia, un órgano o una célula de mamífero que comprende un primer componente que comprende un colorante de hidroetidina, y, un segundo componente que comprende una tinción de ADN de células vivas.

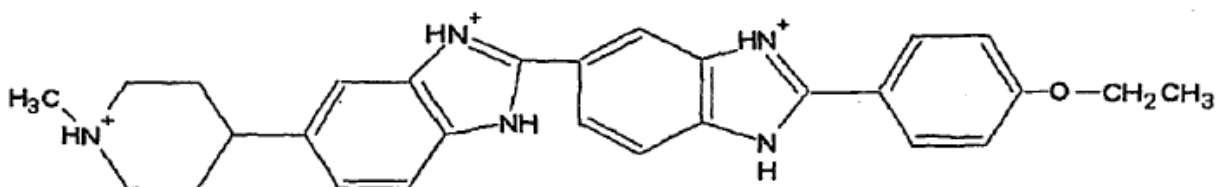
- 45

En una realización a modo de ejemplo del kit de reactivos anterior, la tinción de ADN de células vivas comprende:



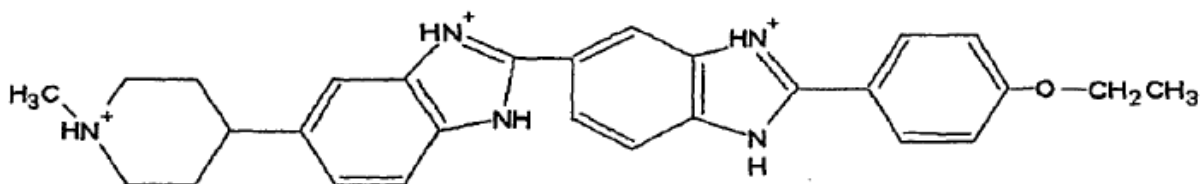
Otro aspecto de la invención es un método de uso del kit anterior para medir la concentración de especies reactivas del oxígeno *ex vivo* en tejido derivado de biopsias, órganos o células de mamífero que comprende las etapas o las acciones de teñir un primer tejido con el colorante de hidroetidina para producir un primer número de unidades de fluorescencia, teñir un segundo tejido con la tinción de ADN de células vivas para producir un segundo número de unidades de fluorescencia, y normalizar el primer número de unidades de fluorescencia con respecto al segundo número de unidades de fluorescencia para cuantificar la concentración de especies reactivas del oxígeno.

En una realización a modo de ejemplo del método anterior, el ADN de células vivas comprende:



Otro aspecto de la invención es un kit de reactivos para medir la concentración de especies reactivas del oxígeno *ex vivo* o *in vivo* en una biopsia, un órgano o una célula de mamífero que comprende un primer componente que comprende un colorante de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína, y, un segundo componente que comprende una tinción de ADN de células vivas.

En una realización a modo de ejemplo del kit de reactivos anterior, el ADN de células vivas comprende:



Otro aspecto de la invención es un método de uso del kit de reactivos anterior para medir la concentración de especies reactivas del oxígeno *ex vivo* en tejido derivado de biopsias, órganos o células de mamífero que comprende las etapas o las acciones de teñir un primer tejido con el colorante de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína para producir un primer número de unidades de fluorescencia, teñir un segundo tejido con la tinción de ADN de células vivas para producir un segundo número de unidades de fluorescencia, y normalizar el primer número de unidades de fluorescencia con respecto al segundo número de unidades de fluorescencia para cuantificar la concentración de especies reactivas del oxígeno.

En una realización a modo de ejemplo del método anterior, el ADN de células vivas comprende:

Breve descripción de los dibujos a modo de ejemplo

La figura 1 es una ilustración esquemática de metabolismo de poliaminas en términos de inducción de SSAT inducida por andrógenos en células de próstata que provoca oxidación de poliaminas y producción de ROS.

La figura 2 es una ilustración esquemática teórica del compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina de la presente invención que actúa como inhibidor de acetil-poliamina oxidasa (APO) y que bloquea la producción de ROS inducida por andrógenos en células de próstata.

La figura 3 es una ilustración gráfica que muestra un diagrama de cuantificación de qRT-PCR de nivel de ARNm de SSAT normalizado con respecto a niveles de ARNm de gliceraldehído-3-fosfodeshidrogenasa en células de cáncer de próstata humanas LNCaP no tratadas, y células tratadas con R1881 0,05 nM o 1,0 nM durante 96 horas, mediante lo cual los datos de qRT-PCR muestran que un tratamiento con R1881 1 nM (un análogo de andrógeno

sintético) aumenta los niveles de ARNm de SSAT en células LNCaP.

La figura 4 es una ilustración gráfica que muestra un diagrama de fluorescencia de DCF/fluorescencia de ADN en células LNCaP a las 72 horas de tratamiento con un concentración creciente de compuesto no androgénico bisetil-norespermina ("BE-3-3-3") en células de cáncer de próstata humanas DU-145, mediante lo cual los datos se normalizan con respecto al porcentaje de células no tratadas control, y mediante lo cual BE-3-3-3 (un inductor conocido de SSAT) aumenta el estrés oxidativo en células DU-145.

Las figuras 5A-5E son ilustraciones gráficas que muestran diagramas de niveles de putrescina (Pu), espermidina (Sd), espermina (Sm), N-acetil-espermidina (N-Ac-Sd) y N-acetil-espermina (N-Ac-Sm) en células de próstata humanas LNCaP tratadas con 25 µg de compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina durante 120 horas, y, con y sin tratamiento con R1881 1 nM durante 96 horas, y células tratadas previamente durante 24 horas con compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina 25 µM seguido por tratamiento con R1881 1 nM durante 96 horas, mediante lo cual los niveles de poliamina se expresan en nmoles/10⁶ células y se determinaron usando el método de HPLC (véase Kabra, PM *et al*, Solid-Phase Extraction and Determination of Dansyl Derivatives of Unconjugated and Acetylated Polyamines by Reverse-Phase Liquid Chromatography: Improved Separation Systems for Polyamines in Cerebrospinal Fluid, Urine and Tissue, J. Chromatogr., 1986;380(1):19-32) usando patrones disponibles comercialmente, y mediante lo cual los datos muestran niveles de poliamina y acetil-poliamina en células LNCaP tratadas con R1881 1 nM ± MDL 72,527 25 µM.

La figura 6 es una ilustración gráfica que muestra un diagrama de fluorescencia de DCF/fluorescencia de ADN en células LNCaP expresado como un porcentaje de células no tratadas control tratadas con concentración creciente de R1881, mediante lo cual los datos muestran que un tratamiento previo con MDL 72,527 bloquea eficazmente la producción de ROS inducida por andrógenos en células LNCaP.

Las figuras 7A-7D incluyen imágenes de secciones de próstata de ratones TRAMPxFVB F1 de 20 semanas de edad (luces prostáticas de ratón híbrido) a los que se les inyectaron 8 mg/kg_{PC} de hidroetidina (HEt) i.v. una hora antes de sacrificarlos (en las que TRAMP es el modelo de adenocarcinoma transgénico de la próstata de ratón), mediante lo cual la figura 7A muestra una imagen de microscopio de contraste de fase representativa de sección de próstata de animales tratados sólo con vehículo, mediante lo cual la figura 7B muestra una imagen de microscopio de fluorescencia de la sección de próstata mostrada en la figura 7A, mediante lo cual la figura 7C muestra una imagen de microscopio de contraste de fase representativa de la sección de próstata de animales sacrificados 2 semanas después de tratamiento con 6 administraciones de 25 mg/kg_{PC} del compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina, mediante lo cual la figura 7D muestra una imagen de microscopio de fluorescencia de HEt de la sección de próstata mostrada en la figura 7C, mediante lo cual todas las imágenes se tomaron con un aumento de 20 X usando un microscopio de fluorescencia Olympus™ BH-2 usando filtros de 480 nm de excitación/600 nm de emisión acoplados con una cámara digital Sony DSC-V3 fijada a F2,8 y 30 s, mediante lo cual las imágenes ilustran una reducción en el estrés oxidativo debido a la administración del fármaco, y mediante lo cual menos fluorescencia de HEt indica menos estrés oxidativo en ratones tratados con MDL 72,527.

La figura 8 es una ilustración gráfica de un diagrama del % de supervivencia de animales frente a la edad de ratones macho TRAMP, mediante lo cual los animales se trataron con 25 mg/kg_{PC} del compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina o control de vehículo de solución salina i.p. con un régimen bisemanal (en semanas marcadas "tx") y se les realizó un seguimiento para determinar la supervivencia, mediante lo cual la supervivencia se determinó por el tiempo hasta el sacrificio debido a la carga tumoral, y mediante lo cual los datos muestran una mejora en la supervivencia global mediante tratamiento con MDL 72,527 en ratones TRAMP.

La figura 9 es una ilustración gráfica de un diagrama de peso corporal de animal (g) frente a edad de animal (semanas) para ratones TRAMPxFVB tratados con 25 mg/kg_{PC} de MDL 72,527 o vehículo de solución salina y un control con un régimen bisemanal (en semanas marcadas "tx"), mediante lo cual los datos demuestran que MDL 72,527 no tiene efectos tóxicos materiales tal como se determina mediante cambios en peso corporal de los ratones TRAMPxFVB.

La figura 10 es una ilustración gráfica de un diagrama de porcentaje de animales con tumor palpable perceptible frente a edad de animal (semanas), mediante lo cual se trataron ratones TRAMPxFVB con 25 mg/kg_{PC} del compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina cada dos semanas (a "tx"), y mediante lo cual los datos demuestran que el tratamiento con MDL 72,527 retrasa el tiempo hasta el desarrollo del tumor en ratones TRAMPxFVB.

La figura 11 es una ilustración gráfica de un diagrama del % de supervivencia de los animales frente a la edad (semanas) de ratones macho TRAMPxFVB, mediante lo cual los animales se trataron con 25 mg/kg_{PC} del compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina o control de vehículo de solución salina i.p. con un régimen bisemanal (en semanas marcadas "tx") y se les realizó un seguimiento para determinar la supervivencia, mediante lo cual la supervivencia se determinó por el tiempo hasta el sacrificio debido a la carga tumoral, y mediante lo cual los datos muestran una mejora en la supervivencia global mediante tratamiento con MDL 72,527 en ratones TRAMPxFVB.

La figura 12 es un análisis de inmunotransferencia tipo Western que muestra que la administración del compuesto

N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina que indujo el bloqueo del efecto de andrógenos en ratones TRAMPxFVB no se debió a la regulación por disminución del receptor de andrógenos ("RA").

La figura 13 muestra un diagrama de fluorescencia de DCF/fluorescencia de ADN que representa niveles de ROS en clones de células LNCaP transfectadas con vector solo o con vector que expresa ARNip frente a SSAT (si22), mediante lo cual las células no se trataron o se trataron con R1881 1 nM durante 96 h, mediante lo cual todos los datos se normalizaron con respecto al de células no tratadas transfectadas con vector solo, mediante lo cual la producción de ROS inducida por R1881 1 nM estaba notablemente reducida en células de clones LNCaP silenciadas con SSAT (si22), y mediante lo cual los datos muestran que la oxidación de poliaminas es la fuente de ROS en PCa.

Las figuras 14 y 15 muestran diagramas de supervivencia de Kaplan-Meier del porcentaje de supervivencia frente a la edad de ratones macho TRAMP en la figura 14 y TRAMPxFVB en la figura 15, mediante lo cual los animales se trataron con o bien 25 mg/kg_{PC} de MDL 72,527 o bien control de vehículo de solución salina mediante inyección intraperitoneal bisemanalmente en semanas marcadas por flechas y se les realizó un seguimiento para determinar la supervivencia, mediante lo cual la supervivencia se determinó por el tiempo hasta el sacrificio debido a la carga tumoral, mediante lo cual (tal como se muestra en la figura 14) MDL 72,527 que se administró con un tratamiento de una vez cada dos semanas x 3 mejoró la supervivencia global de animales TRAMP, y mediante lo cual (tal como se muestra en la figura 15) MDL 72,527 que se administró con un tratamiento de una vez cada 2 semanas x 6 aumentó la supervivencia global de ratones TRAMPxFVB.

La figura 16 muestra un diagrama de animales de veinte semanas de edad con tumor palpable antes de sacrificar 8 de los animales para la determinación por microscopio de la existencia de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) o carcinoma en tejido de próstata mediante examen patológico, mediante lo cual se muestra el tiempo hasta el desarrollo de tumor en animales TRAMPxFVB tratados con MDL 72,527 a 25 mg/kg_{PC} una vez cada dos semanas.

La figura 17 muestra una imagen de tejido de luz prostática humano extirpado quirúrgicamente de hombres no tratados cortado con un espesor de 4-5 mm e incubado en disolución de HET (8 mg/ml) durante 60 min. a 37°C antes del procesamiento de tejido (bloqueo con parafina y corte con micrótopo para micrografía de fluorescencia), mediante lo cual se tomaron imágenes con un aumento de 20X a una longitud de onda de 480 nm de excitación/595 nm de emisión, después de tratamiento que incluyó.

La figura 18 muestra una imagen de la misma sección de luz de próstata humana usada en la figura 17, mediante lo cual la tinción con HET muestra una diferencia entre las células epiteliales y las células estromales, y mediante lo cual los datos confirman alto estrés oxidativo sólo en las células epiteliales prostáticas.

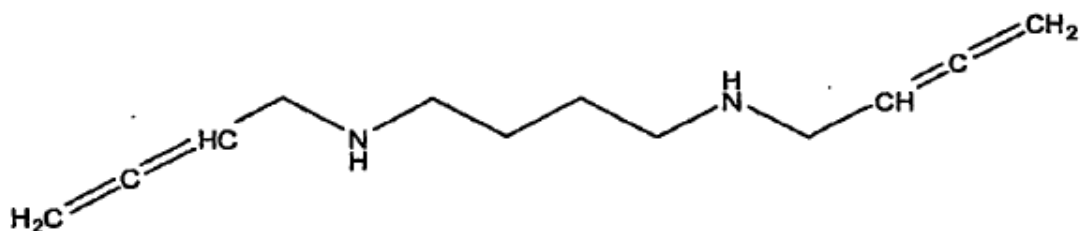
La figura 19 muestra el presente método de preparación de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La invención se refiere a diclorhidrato de N1,N4-bis(buta-1,3-dienil)butan-1,4-diamina (también denominado MDL 72,527 y diclorhidrato de N,N'-di-2,3-butadienil-1,4-butanodiamina), o sales o solvatos del mismo, a su uso en la prevención y/o tratamiento de cáncer de próstata en seres humanos masculinos, por ejemplo reduciendo la concentración de especies reactivas del oxígeno en tejido de glándula prostática humano o cualquier otro tejido corporal, y a métodos de preparación del compuesto del mismo. Otros usos incluyen tratar cáncer de próstata de seres humanos masculinos inhibiendo la acetil-poliamina oxidasa en tejido de próstata humano u otro tejido corporal humano. La invención puede usarse *ex vivo* o *in vivo* en cualquier mamífero tal como un ser humano o un perro.

La presente invención incluye agentes quimioterápicos que reducen específicamente el estrés oxidativo en tejido de próstata previniendo y/o tratando de ese modo la progresión de cáncer de próstata, particularmente en pacientes con alto riesgo. Se ha establecido que se producen especies reactivas del oxígeno ("ROS") en la glándula prostática a niveles relativamente altos en comparación con otros órganos. ROS incluyen, pero no se limitan a, peróxido de hidrógeno, superóxido, radical hidroxilo y ácido nítrico.

Sin limitarse a ninguna teoría, se plantea la teoría de que la administración del presente compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina inhibe los procesos de acetil-poliamina oxidasa ("APAO") y poliamina oxidasa (PAO) bloqueando específicamente la ruta bioquímica para estrés oxidativo inducido por andrógenos (es decir, producción de ROS) y dirigiendo de ese modo la terapia antioxidante hacia tejido de glándula prostática. Se plantea además la teoría de que la administración del presente compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina no tiene efectos materiales adversos sobre la ruta de señalización de andrógenos. A continuación se muestra la estructura de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina.



Preferiblemente, se administra una forma libre, una sal o un solvato de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina a un mamífero humano o no humano. La forma de sal o solvato puede ser cualquier sal o solvato farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la forma de sal farmacéuticamente aceptable es N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina•2HCl. Preferiblemente, la forma de solvato farmacéuticamente aceptable es N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina•2HCl disuelta en un disolvente farmacéuticamente aceptable, tal como un disolvente polar, preferiblemente agua.

Como tal, la administración del presente compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina retrasó satisfactoriamente el desarrollo de tumor de próstata y aumentó la tasa de supervivencia global en el modelo bien aceptado de preclínico de adenocarcinoma transgénico de próstata de ratón ("TRAMP"). (Véase, por ejemplo, Garcia, GE *et al*, 2-Methoxyestradiol Inhibits Prostate Tumor Development in Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate: Role of Tumor Necrosis Factor- α -Simulated Gene 6, Clin Cancer Res 12(3) (1 de febrero de 2006). El modelo TRAMP desarrolla espontáneamente cáncer de próstata y muere de la enfermedad. La administración del presente compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina redujo notablemente el estrés oxidativo en una línea celular de tumor humano dependiente de andrógenos, cultivada, y en lesiones neoplásicas en el animal TRAMP *in vivo*. El presente compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina también puede administrarse como terapia adyuvante para prevenir recidivas en pacientes tratados previamente por tumor de próstata primario.

Se ha notificado que se producen ROS en la glándula prostática a niveles mayores que en otros órganos. ROS altera los genes relacionados con la apoptosis o el crecimiento o bien mediante efectos mutagénicos directos sobre el ADN o bien mediante alteraciones en la expresión génica. Altos niveles de ROS en tejido de próstata pueden desempeñar un papel principal tanto en el inicio como en la progresión del cáncer de próstata. ROS pueden provocar peroxidación de lípidos, alterar la actividad de enzimas dependientes de tiol, o dañar el ADN.

Bajos niveles de ROS actúan como mitógenos induciendo tumor o alteraciones de redox debido a que la producción de ROS desempeña un papel clave en rutas de transducción de señal específicas. Regímenes alimenticios con alto contenido en grasas aumentan la peroxidación de lípidos (produciendo de ese modo ROS) lo que provoca una incidencia relativamente superior de cáncer de próstata en naciones industrializadas en comparación con países en desarrollo. Datos publicados respaldan una disminución de la incidencia de cáncer de próstata cuando el régimen alimenticio incluye antioxidantes alimenticios tales como β -caroteno, β -licopeno, vitamina E y selenio, que reducen los niveles de ROS celulares.

Recientemente, pruebas experimentales y clínicas vinculan directamente un estrés oxidativo aumentado con un desarrollo aumentado de tumores de próstata. Se ha usado inmunohistoquímica para medir el daño oxidativo inducido por estrés oxidativo a bases de ADN en bloques de parafina de archivo de tejidos de próstata humanos malignos y normales quirúrgicamente extirpados. Tejidos de tumor de próstata humano malignos y metastásicos han mostrado modificaciones de bases de ADN y de proteínas inducidas por ROS mayores que tejido de próstata normal. La inmunohistoquímica también ha mostrado que el daño oxidativo a ADN y a proteína es significativamente superior en lesiones preneoplásicas en la próstata de TRAMP en comparación con tejido de próstata normal adyacente.

Se han identificado los andrógenos como agente natural que induce estrés oxidativo en tejido de próstata. El colorante de hidroetidina fluoresce tras oxidación por ROS. Se ha observado la presencia de un alto estrés oxidativo en xenoinjertos de tumor humano LNCaP en ratones desnudos macho *in vivo*. Ese nivel aumentado de estrés oxidativo en ratones que portan tumores se redujo en un plazo de 72 horas después de la castración quirúrgica extirpando la fuente de andrógenos que se produce de manera natural.

Se desconocen los mecanismos moleculares exactos con respecto a la producción de ROS inducida por andrógenos en tejido de próstata. Se han notificado otras rutas que conducen a un aumento de la producción de ROS en células CaP tales como: expresión de factores de transcripción nuclear (como factor de transcripción inducido por hipoxia ("HIF-1 α "), NF- κ B, AP-1, etc.); y supresión de la expresión de glutatión S-transferasa que conduce a niveles reducidos de glutatión total, un agente reductor. Las rutas sugeridas pueden no ser excluyentes entre sí.

Espermidina y espermina son poliaminas en las que la diamina precursora putrescina es un catión orgánico presente en todas las células de mamífero. Tales poliaminas son esenciales para la proliferación y el crecimiento celular. El semen de hombres sanos contiene grandes cantidades de espermina (~ 3 mM) producida principalmente durante la

secreción prostática.

Tal como se muestra en la figura 1, el catabolismo de poliaminas está impulsado por un proceso de espermidina/espermina N-acetiltransferasa ("SSAT") que produce N-acetil-poliaminas. Las N-acetil-poliaminas se oxidan por una enzima constitutiva APAO. APAO usa FAD que se reduce para dar FADH₂ durante la oxidación de las acetil-poliaminas. La FADH₂ se recircula de nuevo para dar FAD regenerando la enzima APAO activa mediante la producción de H₂O₂ (es decir, una ROS). La expresión potenciada de enzimas catabólicas de poliaminas (mediante inducción de factores de transcripción específicos y disminución de glutatión celular total) puede potenciar el estrés oxidativo celular debido al catabolismo de poliaminas.

Tal como se muestra en la figura 1, SSAT es la enzima limitante de la tasa de la ruta catabólica de poliaminas. Las acetil-poliaminas producidas por SSAT funcionan como sustratos para la oxidación de APAO y la producción concomitante de ROS. Datos recientes de microalineamientos de ADN y qRT-PCR sugieren que el andrógeno induce una sobreexpresión de 30-50 veces del gen de SSAT en células de cáncer de próstata humanas LNCaP dependientes de andrógenos.

Está bien aceptado en la técnica que el andrógeno, a concentraciones fisiológicas, induce la producción de ROS en células de cáncer de próstata dependientes de andrógenos. Se usó un ensayo de oxidación de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF) para medir la razón de DCF oxidado:fluorescencia de ADN que es una medida aceptada de niveles de ROS en líneas de células de próstata. Los datos y resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

ROS en células de próstata mediante ensayo de oxidación de DCFH

Línea celular	Medio	Tratamiento	Unidades de fluoresc. de DCF/ADN	d.e.
Células epiteliales de próstata inmortalizadas	F12 de Ham+F(5)	Ninguno	0,09	±0,02
DU-145	DMEM+F(5)	Ninguno	0,33	±0,03
DU-145	DMEM+F(5)	BE-3-3-3 1 µM	0,67	±0,07
DU-145	DMEM+F(5)	BE-3-3-3 1 µM + MDL 72,527 25 µM	0,26	±0,02
LNCaP	DMEM+F(5)	Ninguno	0,99	±0,03
LNCaP	DMEM+(F1/C4)	Ninguno	1,20	±0,02
LNCaP	DMEM+(F1/C4)	R1881 1 nM	3,34	±0,05
LNCaP	DMEM+(F1/C4)	R1881 1 nM + vitamina E 15 µM	1,80	±0,04
LNCaP	DMEM+(F1/C4)	BE-3-3-3 1 µM	3,19	±0,04
LNCaP	DMEM+(F1/C4)	BE-3-3-3 1 µM + MDL 72,527 25 µM	1,87	±0,04

F(5) = suero bovino fetal al 5%

F1/C4 = suero bovino fetal al 1% + suero tratado con carbón vegetal al 4% (reducido en andrógenos)

Se hicieron crecer las células de cáncer de próstata humanas LNCaP en un medio reducido en andrógenos de FBS al 1% y FBS tratado con carbón vegetal al 4%, (F1/C4) y en presencia o ausencia de análogo de andrógeno sintético R1881 1 nM con o sin tratamiento previo con α -tocoferol antioxidante 15 µM (vitamina E). Se muestran los niveles de ROS de células de cáncer de próstata humanas LNCaP y DU-145 como tratadas con BE-3-3-3, que es un agente inductor de SSAT conocido, con o sin tratamiento con MDL 72,527 25 µM.

Los datos en la tabla 1 sugieren que los niveles de ROS en todas las líneas celulares de cáncer de próstata son relativamente superiores a los niveles observados en células epiteliales prostáticas normales. Los datos en la tabla 1 también sugieren que las células LNCaP tienen relativamente más ROS que las células DU-145; que el análogo de andrógeno R1881 a una concentración de 1 nM, que es comparable a los niveles fisiológicos de andrógeno, que potencia el nivel de ROS en células LNCaP; que una dosis inferior a la letal de BE-3-3-3 (1 µM) potencia los niveles de ROS en ambas líneas celulares; y que la potenciación del nivel de ROS se invierte/reduce/evita mediante tratamiento previo con vitamina E y/o MDL 72,527.

Tal como se muestra esquemáticamente en la figura 1, niveles inusualmente altos de poliaminas en células de próstata y alta inducción de SSAT pueden inducir grandes aumentos en niveles de ROS. Se realizó un análisis de microalineamientos de ADN de expresión génica en células LNCaP no tratadas control y células tratadas con análogo de andrógeno R1881 1 nM durante 96 horas dos veces usando Affymetrix Genechip Arrays. En ambos

experimentos, se identificó claramente que SSAT estaba altamente sobreexpresado en células LNCaP tratadas con R1881 en comparación con células control no tratadas. Entre la lista de genes que están sobreexpresados (más de 10 veces en relación al control), SSAT fue la única enzima relacionada con la ruta de generación de ROS.

En la figura 3 se muestran datos generados usando el microalineamiento de ADN y qRT-PCR. Cada punto de datos es un promedio de las lecturas de una cantidad de seis pocillos tratados idénticamente repetidas dos veces por triplicado. Los datos de qRT-PCR muestran un aumento de 50 veces en la expresión génica de SSAT de células LNCaP tratadas con R1881 en comparación con las células control no tratadas. Se observa además que SSAT sólo estaba sobreexpresado en células tratadas con R1881 1 nM (que induce estrés oxidativo) pero no en células tratadas con R1881 0,05 nM en las que no se observó ningún aumento de estrés oxidativo. Por tanto, puede postularse que la expresión génica de SSAT inducida por andrógenos es un factor contribuyente significativo para la producción de ROS celular en células de cáncer de próstata dependientes de andrógenos.

La figura 4 muestra el papel de SSAT en la producción de ROS celular usando bisetilnoespermina (BE-3-3-3). Se sabe que BE-3-3-3 induce actividad enzimática de SSAT en diversas líneas celulares incluyendo células de cáncer de próstata LNCaP dependiente de andrógenos y DU-145 independiente de andrógenos. Se trataron células DU-145 con concentraciones crecientes de BE-3-3-3 durante 72 horas. Se midió el estrés oxidativo usando un ensayo de oxidación de colorante de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína ("DCF") basado en placa de 96 pocillos. Cada punto de datos es un promedio de una cantidad de 6 pocillos tratados idénticamente repetidos dos veces por triplicado. Los datos demuestran que BE-3-3-3 (a una dosis no citotóxica, <1 µM) aumenta la oxidación de poliaminas y aumenta los niveles de ROS celulares, y que la oxidación de poliaminas es un factor significativo para producir estrés oxidativo en células prostáticas.

Las figuras 5A-5E muestran el efecto de tratar previamente células LNCaP (habiéndose tratado y no con R1881) con el presente compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina sobre los niveles de poliamina y acetil-poliamina. Se usó el método de cuantificación por HPLC para cuantificar los niveles de poliamina y acetil-poliamina en células LNCaP tratadas con R1881 1 nM ± MDL 72,527 25 µM. Cada punto de datos es un promedio de 2 determinaciones de sedimentos celulares recogidos de una cantidad de 3 experimentos independientes. Las figuras 5A-5E muestran que un tratamiento con R1881 (a una concentración final de 1 nM durante 96 horas) disminuye significativamente los niveles de putrescina y espermidina, disminuye el nivel de espermina, y aumenta los niveles de N-acetil-espermidina y N-acetil-espermina.

Puede establecerse que las figuras 5A-5E respaldan la conclusión que un tratamiento con R1881 aumenta los niveles de ARNm de SSAT mientras que potencia la actividad enzimática de SSAT. En células con R1881, un tratamiento previo con el presente compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina bloqueó casi completamente el aumento inducido en los niveles de putrescina y espermidina (que pueden atribuirse a R1881 1 nM), y esto provocó un aumento significativo en los niveles de N-acetil-espermidina y N-acetil-espermina sin cambiar de manera apreciable el nivel de espermina. Se observó un aumento insignificamente pequeño en el nivel de N-Ac-espermina en células tratadas con el presente compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina. También se observó que células tratadas con MDL 72,527 a 25 µM bloquearon eficiente y eficazmente la actividad de APAO. El gran aumento observado en los niveles de acetil-poliamina también sugiere que la administración de MDL 72,527 no tiene ningún efecto material sobre la expresión génica y/o la actividad enzimática de SSAT en células tratadas con andrógenos.

En la figura 6 se muestran datos que demuestran que la administración de un tratamiento previo de MDL 72,527 25 µM bloquea eficazmente la producción de ROS inducida por andrógenos en células LNCaP. Se indujeron niveles de ROS en células LNCaP aumentando la concentración de R1881 durante 96 horas con y sin el tratamiento previo con MDL 72,527. Se determinaron los resultados usando métodos de ensayo de oxidación de DCF. Cada punto de datos es un promedio de las lecturas de una cantidad de 6 pocillos repetidas dos veces por triplicado. Se normalizaron los datos referentes a los niveles de ROS de células tratadas previamente con el compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina con respecto a los efectos de la administración de MDL 72,527 solo. Los datos en la figura 6 sugieren que un tratamiento previo usando MDL 72,527 (≥1 nM) bloquea eficazmente la producción de ROS inducida por R1881. Los datos también sugieren que una inhibición de poliamina oxidasa usando MDL 72,527 reduce significativamente los niveles de ROS celulares en células de cáncer de próstata dependientes de andrógenos, y que MDL 72,527 es un antioxidante eficaz que bloquea específicamente la producción de ROS inducida por andrógenos en células de cáncer de próstata humanas dependientes de andrógenos.

Las figuras 7A-7D muestran que la administración del compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina reduce el estrés oxidativo en tejido de próstata en animales TRAMPxPVB *in vivo*. Se normalizó un método que usa oxidación de colorante de hidroetidina (HET) para observar el estrés oxidativo en tumores de próstata *in vivo*. HET se oxida para dar específicamente 2-hidroxi-etidio mediante un ROS(41). El 2-hidroxi-etidio fluoresce a frecuencias de 488 nm de excitación y de 595 nm de emisión. El colorante de HET puede inyectarse de manera segura en animales al menos 1 hora antes del sacrificio. A animales TRAMPxPVB de veinte semanas de edad se les inyectó HET (8 mg/kg_{PC}) 1 hora antes del sacrificio. Después del sacrificio, se recogieron las glándulas prostáticas, se fijaron con formalina y se incrustaron en parafina. Se realizaron cortes con micrótopo de los bloques de parafina, y se eliminó la parafina de los tejidos, se observaron usando microscopía de fluorescencia y se analizaron usando un análisis de imágenes digitales. Las imágenes se muestran en las figuras 7A-7D.

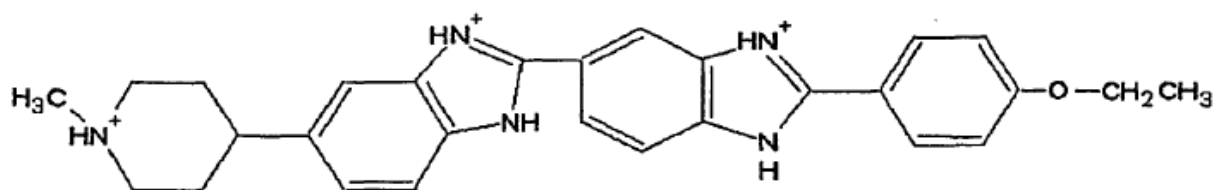
La figura 7A muestra una imagen de microscopio de contraste de fase de una sección de próstata de animales tratados sólo con vehículo. La figura 7B muestra una imagen de microscopio de fluorescencia de la sección de próstata mostrada en la figura 7A. La figura 7C muestra la imagen de microscopio de contraste de fase de la sección de próstata de animales sacrificados 2 semanas después del tratamiento con 6 administraciones de 25 mg/kg_{PC} de MDL 72,527. La figura 7D muestra una imagen de microscopio de fluorescencia de HET de la sección de próstata mostrada en la figura 7C. Las imágenes mostradas en las figuras 7A-7D se tomaron con un aumento de 20X usando un microscopio de fluorescencia Olympus BH-2 usando filtros de 480 nm de excitación/600 nm de emisión acoplado con una cámara digital Sony DSC-V3 fijada a F2,8 y 30 s de exposición.

Generalmente se observó una alta fluorescencia (debido a la oxidación de HET) en la luz prostática, particularmente en los bordes de las células invasoras, que comenzaban a formar neoplasia intraepitelial prostática (PIN). En contraposición, no se detectó oxidación de colorante en los tejidos de ratones TRAMP prostáticos tratados con MDL 72,527 (véase la figura 7D) tal como se confirmó mediante la tinción posterior con H y E. Los datos mostrados en las figuras 7A-7D sugieren que el compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina inhibe significativamente el estrés oxidativo *in vivo* dentro de la luz prostática de ratones TRAMP que comenzaban a formar PIN, lo que sugiere además que la oxidación de poliaminas es un factor contribuyente significativo para el estrés oxidativo en células de próstata humanas cultivadas y la luz prostática de animales TRAMP *in vivo*.

Ensayo de oxidación de DCFH. Se sometieron a ensayo los cultivos de 96 pocillos o tejidos humanos o animales recién resecados para una estimación de niveles de ROS en células intactas usando el colorante diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Se lavaron cultivos de células o tejidos resecados con 200 µl de tampón Krebs-Ringer (NaCl 116 mM, KCl 4,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, NaH₂PO₄ 1,6 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 22 mM y D-glucosa 11 mM), se precalentaron hasta 37°C, se incubaron a 37°C en 100 µl de tampón Krebs-Ringer que contenía colorante de DCF 10 µg/ml (concentración final) durante 45 minutos. Se exploró cada placa de cultivo de 96 pocillos con un explorador de placas CytoFluor 2350™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando las frecuencias de 485 de excitación/530 de emisión. Se exploró cada muestra de tejido.

Ensayo de hidroetidina. Se disolvió colorante de hidroetidina en DMSO (100 mg/ml) y se diluyó en solución salina isotónica hasta 1 mg/ml antes de la inyección. O bien el colorante se inyectó i.v. en los ratones a través de la vena de la cola 1 hora antes del sacrificio (*in vivo*) o bien se lavaron tejidos animales y humanos recién resecados en PBS isotónica y se empaparon en disolución de colorante 8 mg/ml en tampón Krebs-Ringer precalentado a 37°C durante 60 minutos a 37°C (*ex vivo*) antes de su procesamiento. Para ensayos *in vivo*, se sacrificaron los animales y se sangraron antes de recoger el tumor y otros tejidos. Se incrustaron los tejidos después de tratamiento en bloques de parafina. Se montaron cortes con micrótopo de los bloques sobre portaobjetos y se cuantificaron para determinar fluorescencia a frecuencias de 488 nm de excitación/595 nm de emisión.

Ensayo de ADN. Se añadieron cincuenta µl de tampón de Krebs-Ringer (40 µg/ml) que contenía colorante Hoechst 33342, que contiene



a cada pocillo 45 minutos y a todos los tejidos 60 minutos después de las mediciones de fluorescencia. Se determinó la fluorescencia de ADN a 360 nm de excitación/460 nm de emisión. Se normalizaron todas las fluorescencias de DCF o hidroetidina con respecto a fluorescencia de ADN para una cuantificación apropiada del estrés oxidativo.

BD Bioimager. Se cuantificaron todas las lecturas de fluorescencia usando un sistema de obtención de imágenes de punto final, cinético de células individuales, en tiempo real, confocal, automatizado BD Pathway Bioimager (BD Biosciences (Laguna Hills, CA)).

Los datos mostrados en la figura 8 sugieren que la administración del compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina aumenta la tasa de supervivencia global ("SG") de ratones TRAMP. Se sometieron a prueba ratones TRAMP que forman espontáneamente tumores de próstata a las 20-22 semanas de edad y que mueren principalmente de la carga tumoral a las 30-32 semanas en edad. También se sometieron a prueba ratones TRAMPxFVB que empiezan a formar tumores de próstata a las 12-14 semanas de edad y que mueren principalmente de la carga tumoral a las 20-22 semanas de edad (datos mostrados en las figuras 9-11). Tal como se muestra en la figura 9, se usó una dosis de 25 mg/kg_{PC} de MDL 72,527, que se toleró bien (es decir, no se observaron signos manifiestos de toxicidad, comportamiento anómalo o pérdida de peso corporal). Se requirió una dosis por encima de 20 mg/kg_{PC} para inhibir completamente la acetil-poliamina oxidasa de ratón.

En el estudio de animales TRAMP, se administró el compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina a las 22 semanas, mediante lo cual unos pocos animales habían empezado a mostrar tumores palpables. A los animales (en una cantidad de 5 en cada grupo) se les inyectaron 3 veces 25 mg/kg_{PC} de MDL 72,527 i.p. con un régimen bisemanal. En la figura 8 se muestra la SG, que sugiere una mejora significativa en comparación con animales tratados con el vehículo.

En el estudio que usa los ratones TRAMPxFVB, una cantidad de 8 animales estuvieron en el grupo tratado con MDL 72,527, y una cantidad de 8 ratones estuvieron en el grupo tratado con vehículo. Puesto que estos animales comienzan un desarrollo de tumor de próstata a una edad más temprana que los animales TRAMP, el tratamiento comenzó a las 8 semanas de edad. El tratamiento incluyó una cantidad de 6 inyecciones de MDL 72,527 a 25 mg/kg_{PC} i.p. en un programa de régimen de administración bisemanal. Los resultados se muestran en la figura 11 que sugieren un aumento significativo de la SG para los animales tratados con MDL 72,527 en comparación con el control de vehículo. Más del 60% de los ratones TRAMPxFVB tratados con MDL 72,527 sobrevivieron al menos 8 semanas después del final de la terapia, y al menos 6 semanas después de la muerte de todo el grupo de animales tratados con el vehículo control. Los datos en las figuras 8 y 9 muestran que diferentes cepas de animales TRAMP muestran de manera reproducible un beneficio de supervivencia de más del 60% para animales tratados con MDL 72,527 en comparación con los ratones tratados con vehículo.

Los datos mostrados en la figura 10 sugieren que la administración del compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina retrasa el tiempo hasta el desarrollo de tumor en ratones TRAMPxFVB. Se monitorizaron signos de desarrollo de tumor de próstata palpable dos veces por semana. Se interrumpió a las 11 semanas (animales de 29 semanas de edad) después del tratamiento con MDL 72,527 (a 25 mg/kg_{PC}, administrado una vez bisemanalmente), más del 40% de los ratones tratados no mostraron signos de tumor palpable en la próstata ni en ninguna otra parte del cuerpo.

Los datos mostrados en las figuras 1-18 demuestran que el compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina bloquea eficazmente el estrés oxidativo inducido por andrógenos en células de cáncer de próstata humanas y en la glándula prostática de animales TRAMP. Los datos también muestran que MDL 72,527 retrasa el tiempo hasta el desarrollo de tumor en animales TRAMP dando como resultado un aumento estadísticamente significativo de la SG.

Otro aspecto de la invención es una síntesis mejorada de preparación de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina. MDL 72,527 es inhibidor potente, irreversible, de poliamina oxidasa de mamífero y muestra una K_i de 0,9 mM frente a poliamina oxidasa hepática de cerdo. Una síntesis conocida de MDL implica convertir propargilamina protegida con N-Boc en el bis(aleno) correspondiente, seguido por acoplamiento de 2 equivalentes del aleno protegido a 1,4-diyodobutano. La desprotección del (bis)aleno protegido con N-Boc resultante proporcionó MDL 72,527. La síntesis conocida es problemática porque la naturaleza electrófila del resto aleno proporcionó varios productos secundarios durante la alquilación del diyoduro. El rendimiento global es desventajosamente bajo.

El presente método de preparación de N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina tiene un rendimiento ventajosamente alto. El presente método también evita la preparación de productos secundarios no deseados. El presente método se expone en la figura 19.

Se protege con (bis)-N-Boc putrescina 1 disponible comercialmente para producir el compuesto 2 (rendimiento del 85,2%). Se usa el compuesto 2 para alquilar una cantidad de 2 equivalentes de bromuro de propargilo en presencia de hidruro de sodio produciendo el compuesto 3 (rendimiento del 59,5%). Los rendimientos en esa transformación se potencian adicionalmente usando una mezcla de dimetilformamida ("DMF") y tetrahidrofurano ("THF") en una razón de 1:5. Los grupos propargilo en el compuesto 3 se convierten en los alenos correspondientes en presencia de CuBr, formaldehído, y diisopropilamina para producir el compuesto intermedio 4 (rendimiento del 38,7%). Se desprotege el compuesto 4 en presencia de HCl para producir la molécula objetivo deseada MDL 72,527 (sólido de color blanco, rendimiento del 65,8%).

El método de cuantificación por HPLC de MDL, poliaminas naturales y sus derivados de acetilo en extractos celulares así como en suero humano y de animal está normalizado. Por tanto, pueden determinarse la farmacocinética y farmacodinámica de MDL 72,527.

Las sales del presente compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina pueden ser una sal farmacéuticamente adecuada (es decir, farmacéuticamente aceptable) incluyendo, pero sin limitarse a, sales de adición de ácido formadas mezclando una disolución del compuesto MDL con una disolución de un ácido farmacéuticamente aceptable. El ácido farmacéuticamente aceptable puede ser ácido clorhídrico, ácido metanosulfónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico. En la técnica se conocen bien diversas sales farmacéuticamente aceptables y pueden usarse con N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina tales como las dadas a conocer en (Berge SM *et al.*, "Pharmaceutical Salts" J. Pharm. Sci. 66:1-19 (1977) y Haynes DA *et al.*, "Occurrence of pharmaceutically acceptable anions and cations in the Cambridge Structural Database" J. Pharm. Sci. 94:2111-2120 (2005), que se incorporan en el presente documento como referencia). Por ejemplo, la lista de las sales comercializadas aprobadas por la FDA incluye acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, diclorhidrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato,

gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, mitrato, pamoato, pantotenato, fosfato, difosfato, poligalacturonato, salicilato; estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teocato y trietioduro.

- 5 El compuesto N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina (o sal o solvato de la misma) puede administrarse como una forma farmacéutica oral tal como comprimidos no recubiertos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina dura o blanda, polvos, cápsulas, grageas, disoluciones, suspensiones, elixires o emulsiones. La forma farmacéutica oral puede administrarse según un régimen de dosificación para conseguir un efecto terapéutico adecuado. La forma farmacéutica oral también se define por una composición farmacéutica que comprende el principio activo
- 10 farmacéutico (API) y diversos portadores (acuosos, no acuosos, disoluciones, suspensiones o emulsiones), excipientes, disolventes, aditivos, vehículos, estabilizadores, diluyentes inertes, aglutinantes (por ejemplo, goma arábiga, almidón de maíz, gelatina), agentes disgregantes (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico), lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio) y similares farmacéuticamente aceptables/adecuados.
- 15 Por ejemplo, los portadores acuosos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, gomas, almidones, azúcares, lactosa, sacarosa, materiales celulósicos, agua, mezclas de alcohol/agua, tampón fosfato (0,01-0,1 M, o más preferiblemente 0,05 M) y solución salina al 0,9%. Los disolventes no acuosos incluyen, pero no se limitan a, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal (por ejemplo, aceite de oliva, oleato de etilo y similares). También pueden usarse diversos excipientes farmacéuticamente aceptables, aprobados por la USP, incluyendo,
- 20 pero sin limitarse a, albúmina, gelatina, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares y similares), agentes de solubilización (por ejemplo, glicerol, polietilenglicerol y similares), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio y similares), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabeno y similares), ácidos grasos, ceras, poloxámeros, poloxaminas, sustancias de carga o modificadores de la tonicidad (por ejemplo, lactosa, manitol y similares), polímeros para unión covalente o
- 25 complejación con iones de metales, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), agentes de hidrogel, liposomas, agentes de microemulsión, agentes de micelas, agentes milamelares, vesículas multilamelares, agentes de fantasmas de eritrocitos o agentes de esferoplastos.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que es N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso como monoterapia en el tratamiento de cáncer en la próstata de un ser humano masculino.
- 5 2. Compuesto que es N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso como monoterapia en el tratamiento profiláctico de cáncer en la próstata de un ser humano masculino.
3. Compuesto que es N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso como monoterapia en el tratamiento de cáncer en la próstata de un mamífero no humano macho.
- 10 4. Compuesto que es N,N'-bis(2,3-butadienil)-1,4-butanodiamina o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso como monoterapia en el tratamiento de cáncer en la próstata de un ser humano masculino mediante la inhibición de acetil-poliamina oxidasa.
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sal es una sal de diclorhidrato.
- 15 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se usa en una cantidad terapéutica suficiente para detener o reducir la progresión, morbilidad y/o mortalidad debida a cáncer de próstata.
7. Compuesto según la reivindicación 6, en el que la cantidad terapéutica está en el intervalo de aproximadamente 1-100 mg/kg_{PC}, y en el que la cantidad terapéutica se administra en dosis en el intervalo de bisemanal a diariamente.
- 20 8. Compuesto según la reivindicación 7, en el que la cantidad terapéutica está en el intervalo de aproximadamente 10-40 mg/kg_{PC}, y en el que la cantidad terapéutica se administra en dosis semanalmente.
9. Compuesto según la reivindicación 7, en el que la cantidad terapéutica es de aproximadamente 25 mg/kg_{PC}, y en el que la cantidad terapéutica se administra en dosis bisemanalmente.
- 25 10. Compuesto según la reivindicación 4, en el que la acetil-poliamina oxidasa se inhibe en al menos el 50% en comparación con un ser humano masculino no tratado.

**Biosíntesis de poliaminas
(alta en la próstata)**

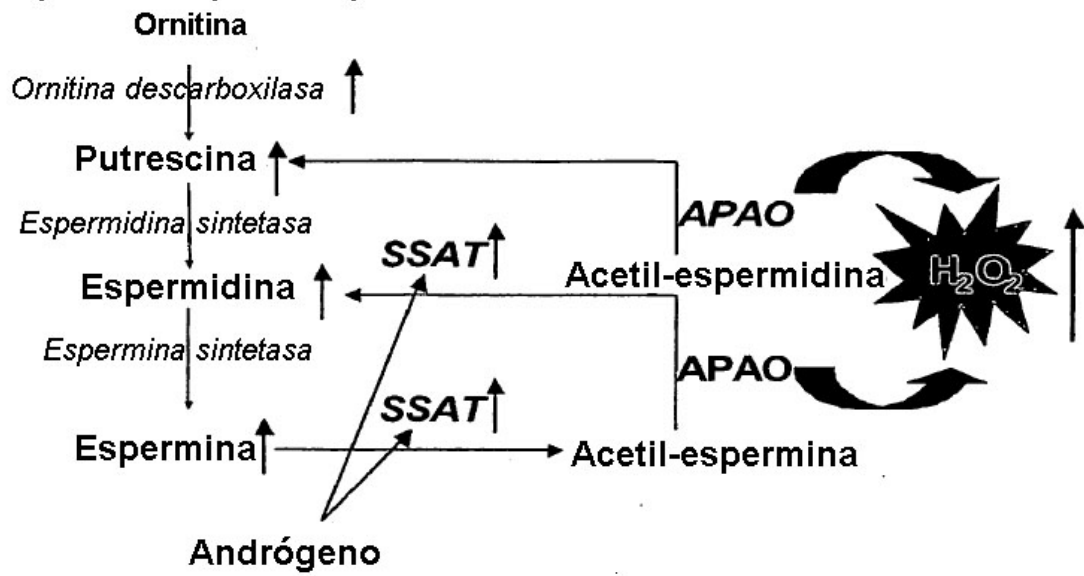


FIG. 1

**Biosíntesis de poliaminas
(alta en la próstata)**

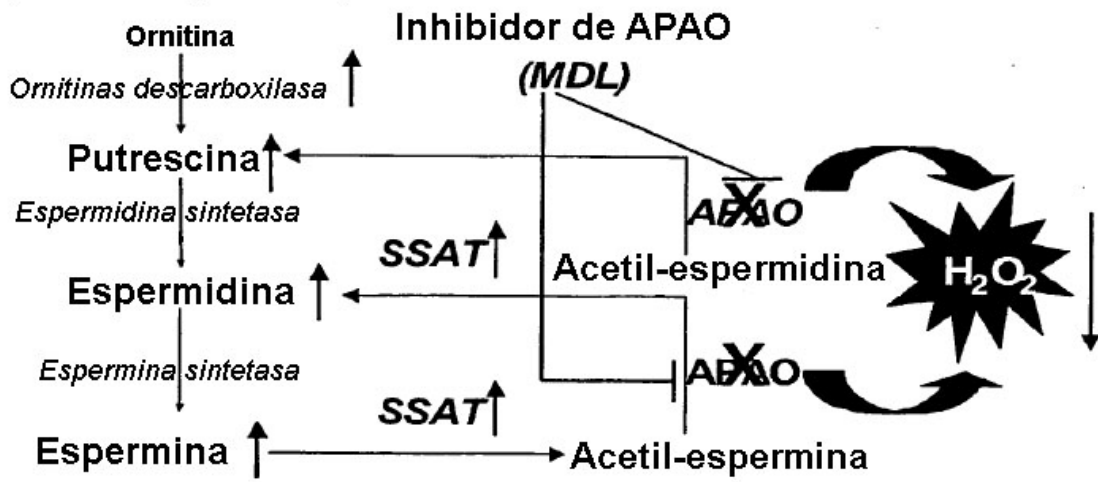


FIG. 2

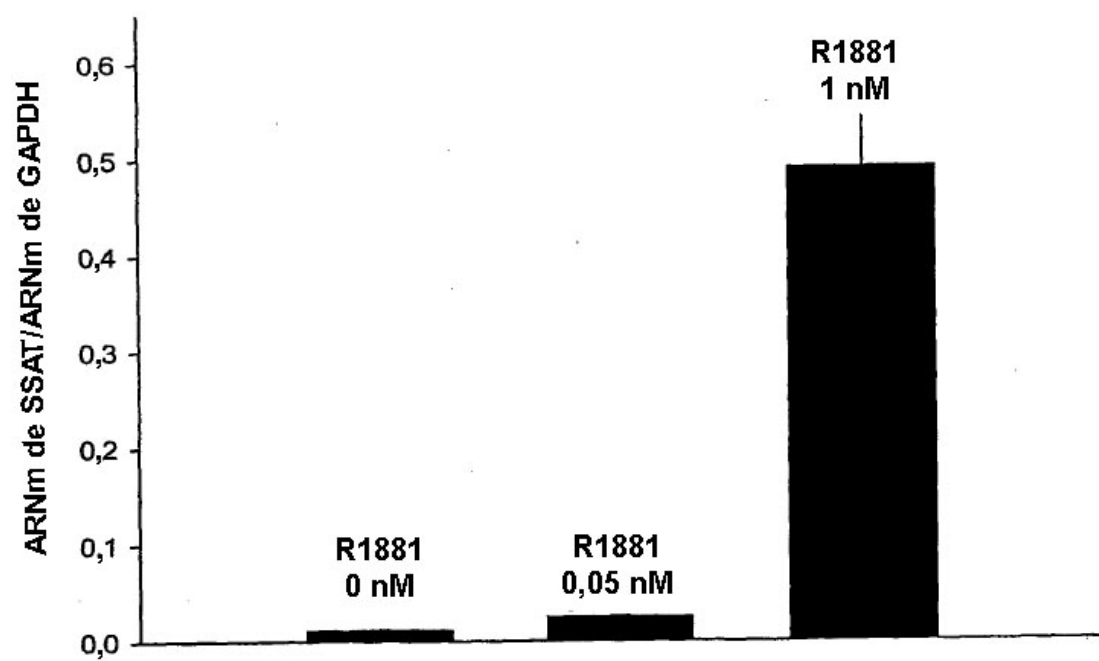


FIG. 3

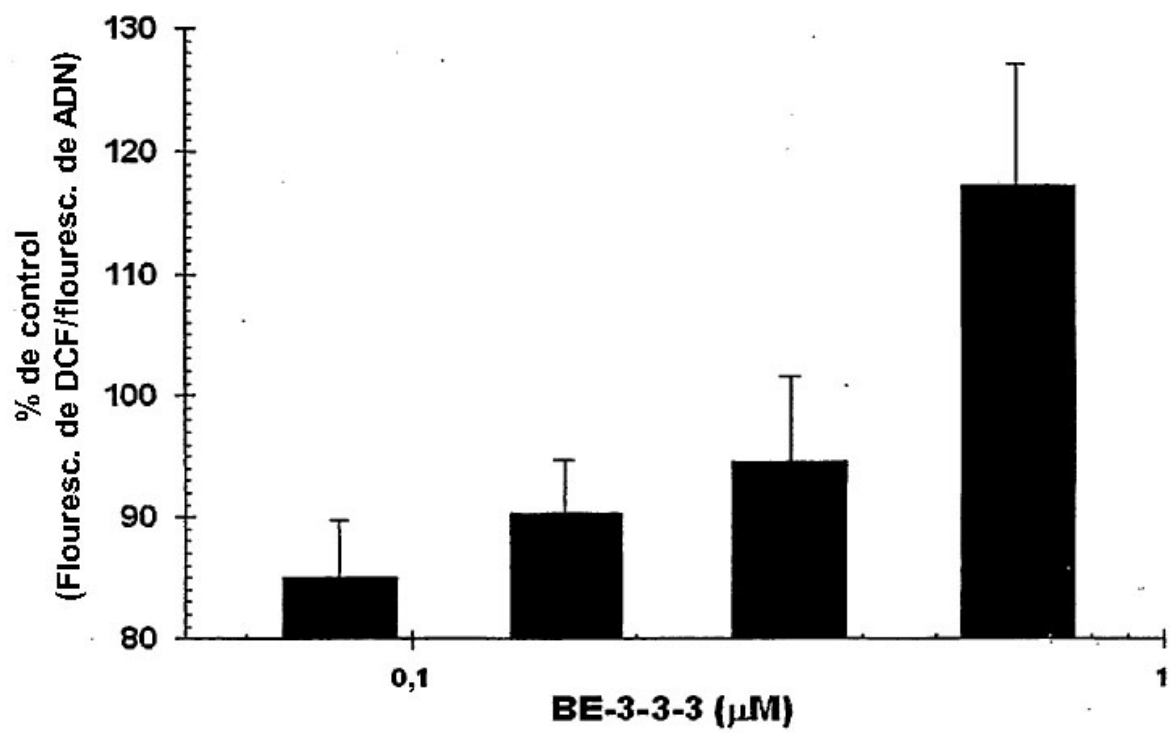


FIG. 4

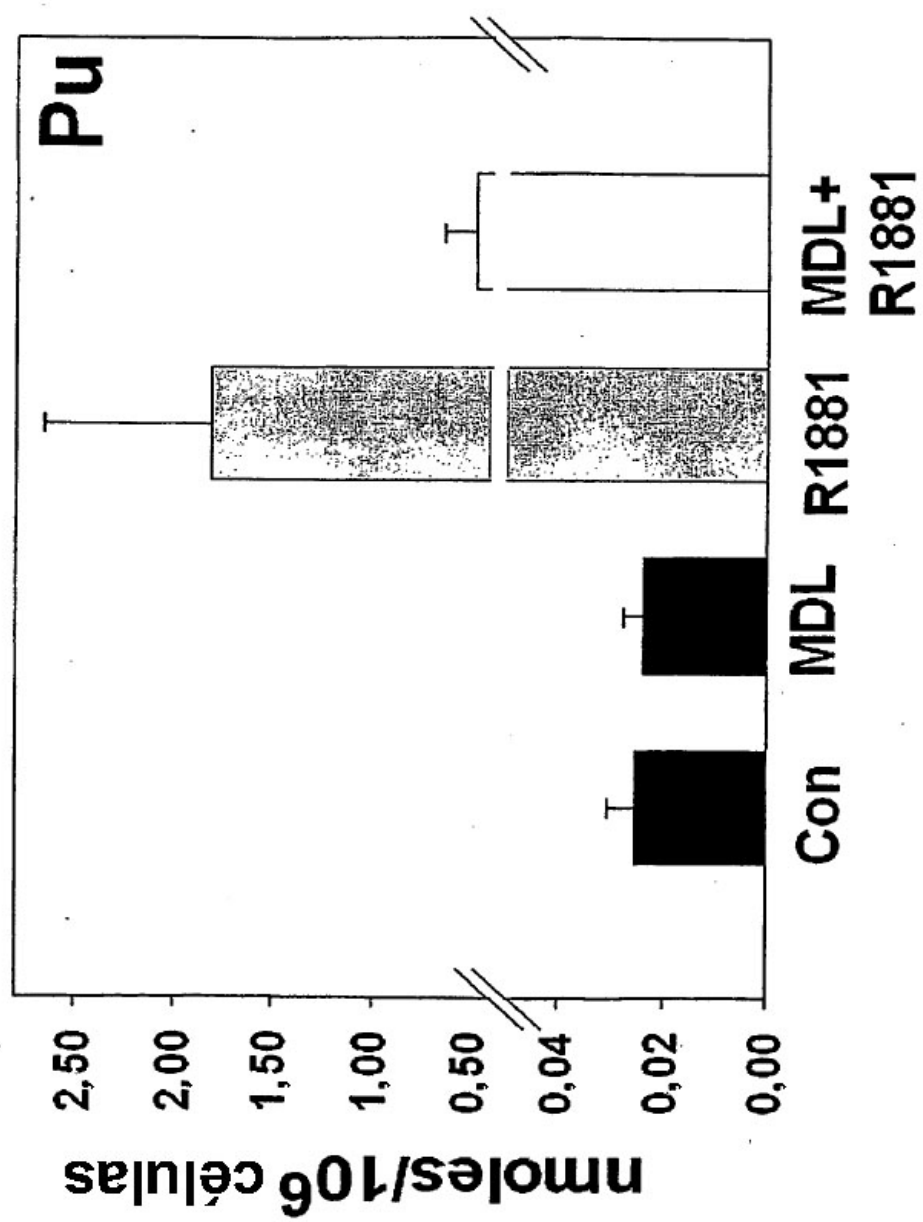


FIG. 5A

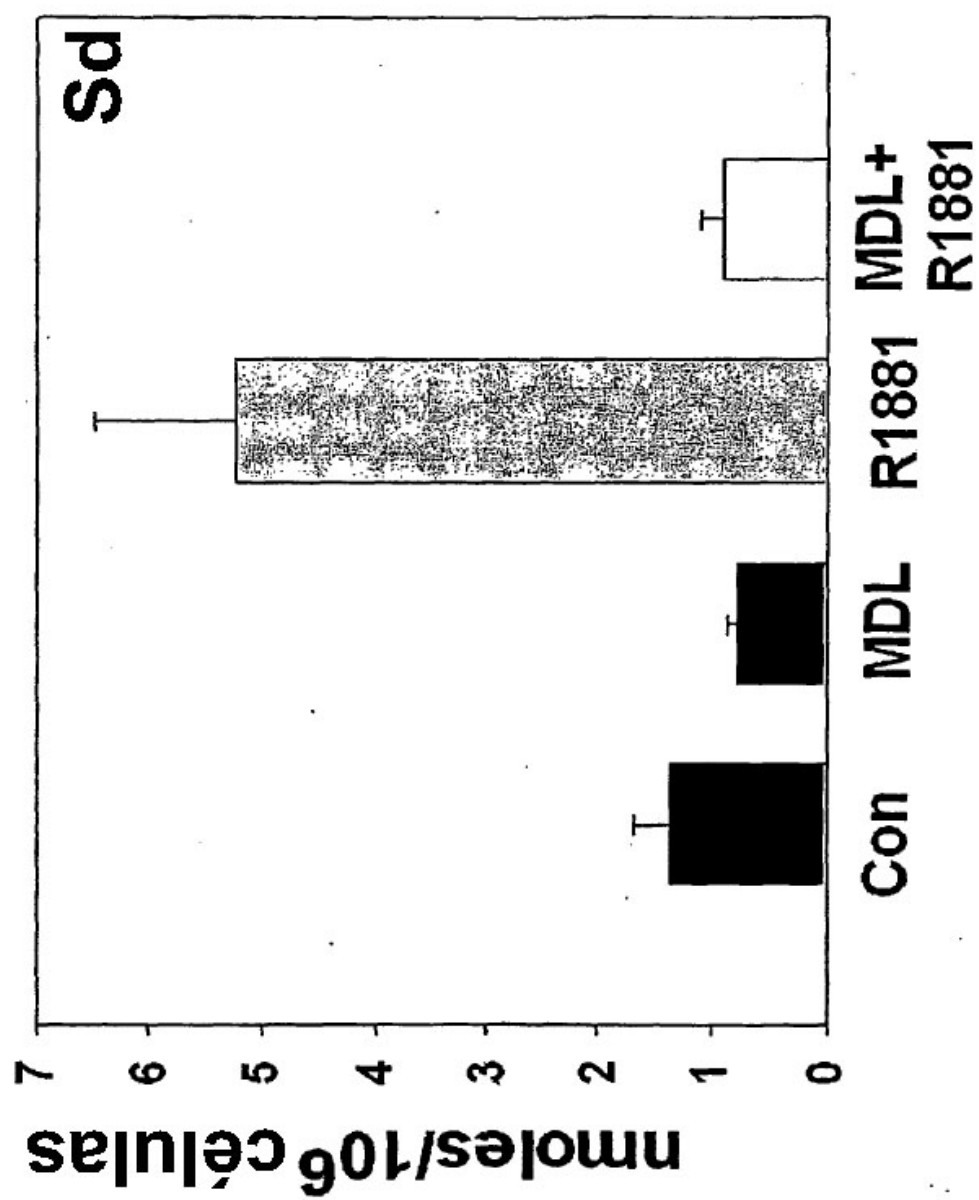


FIG. 5B

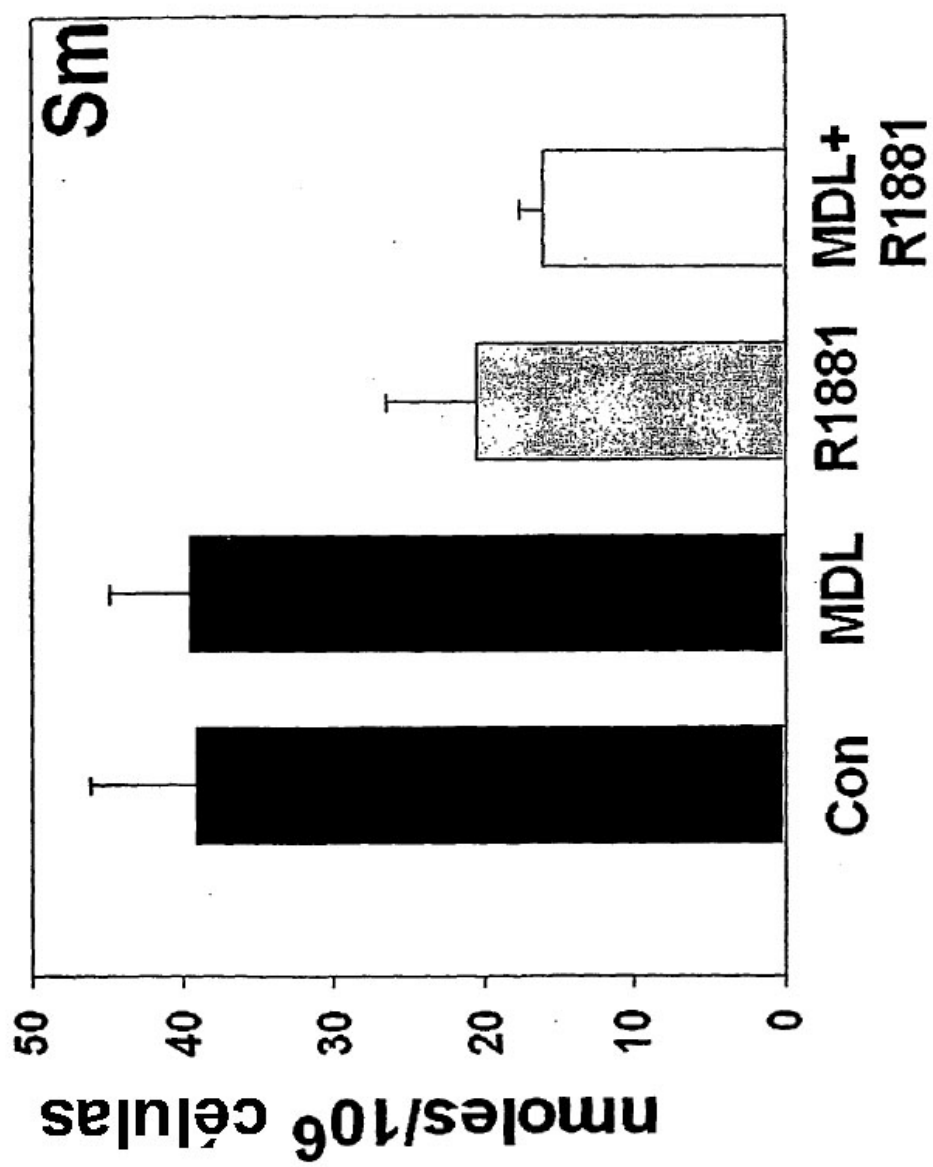


FIG. 5C

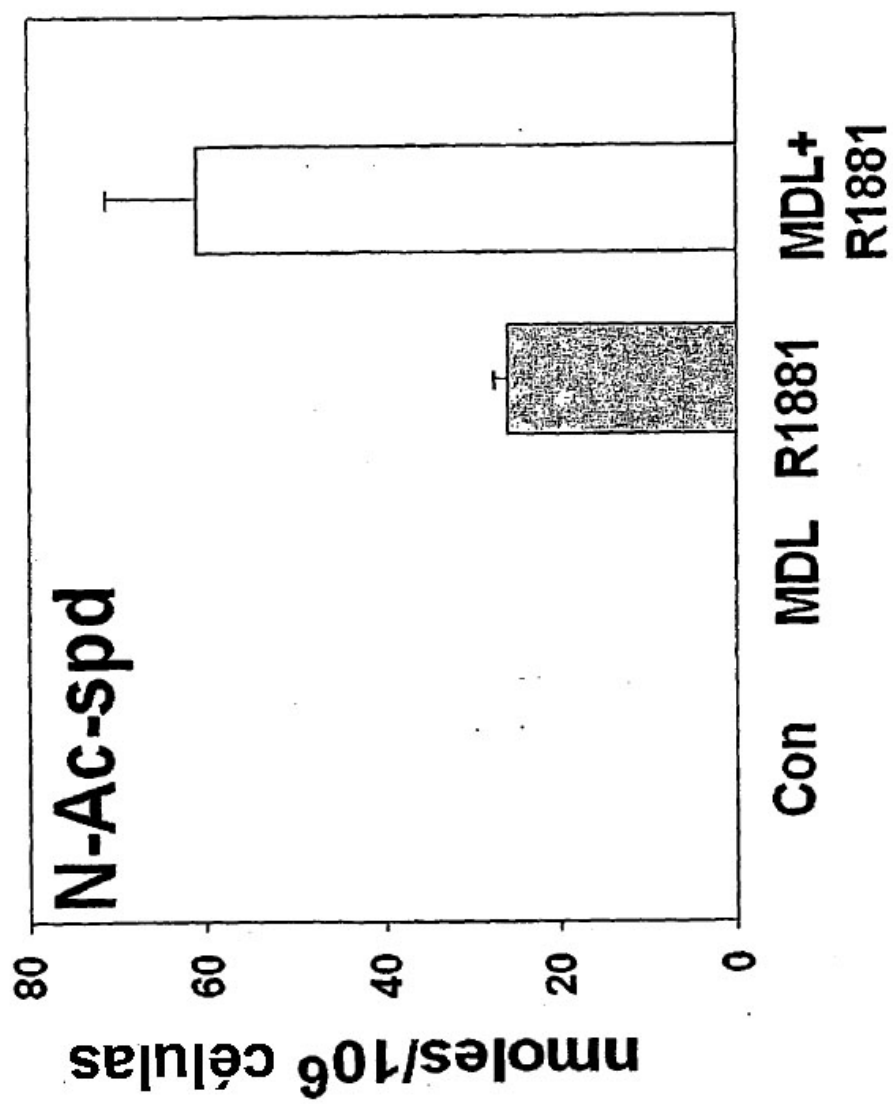


FIG. 5D

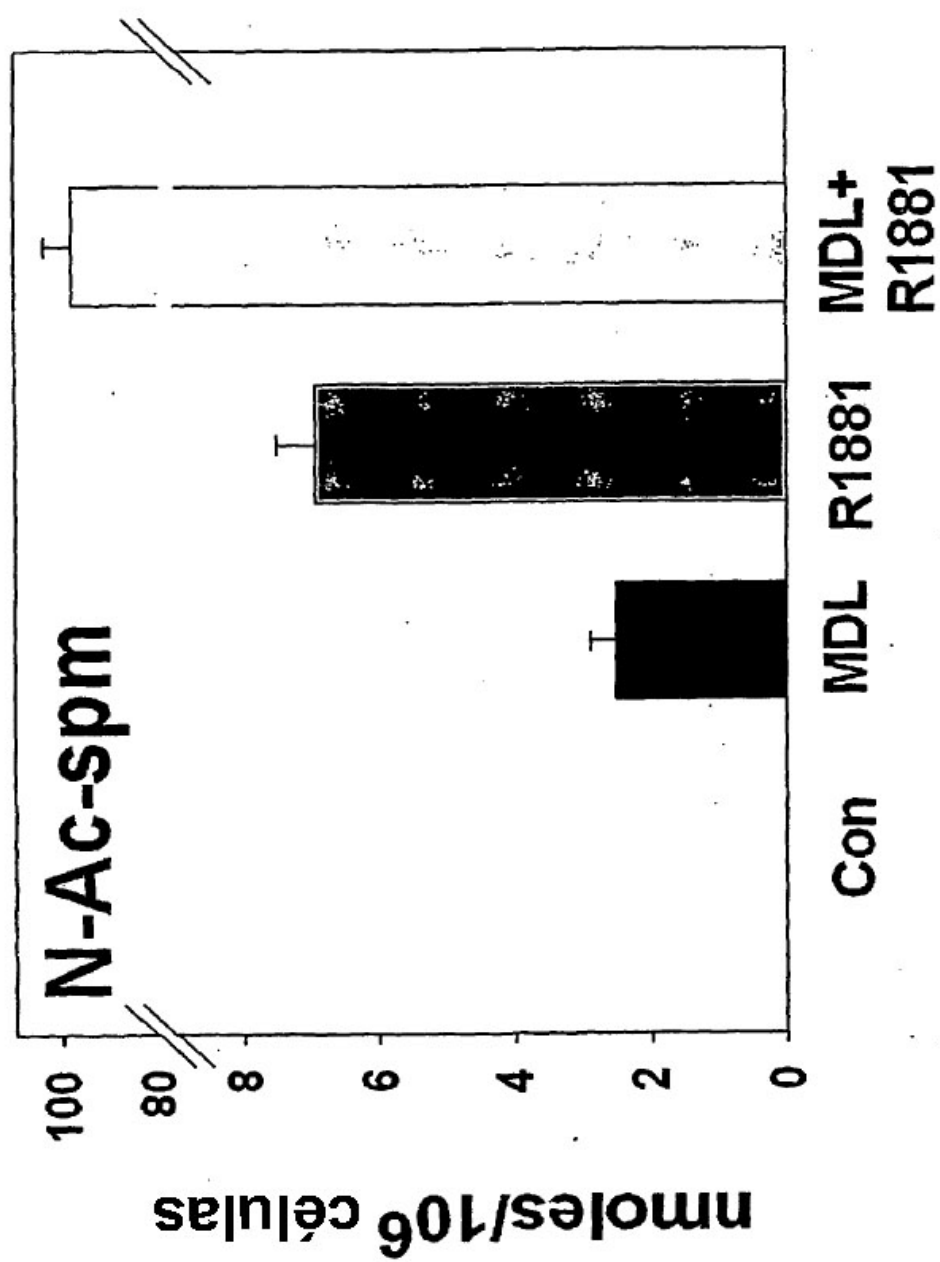


FIG. 5E

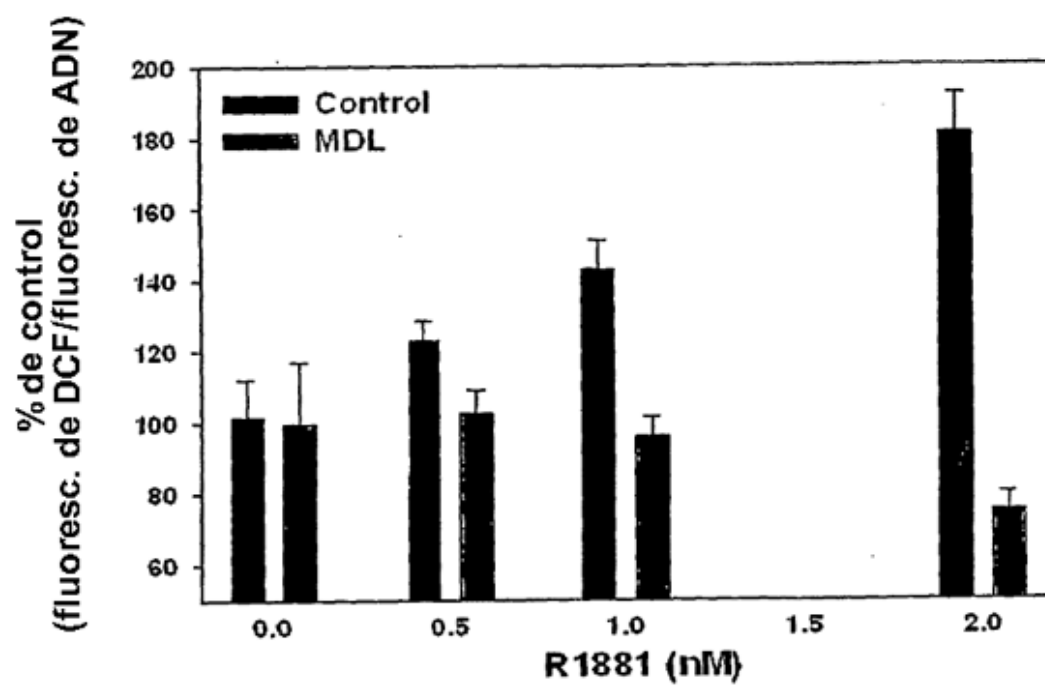
FIG. 6



FIG. 7A

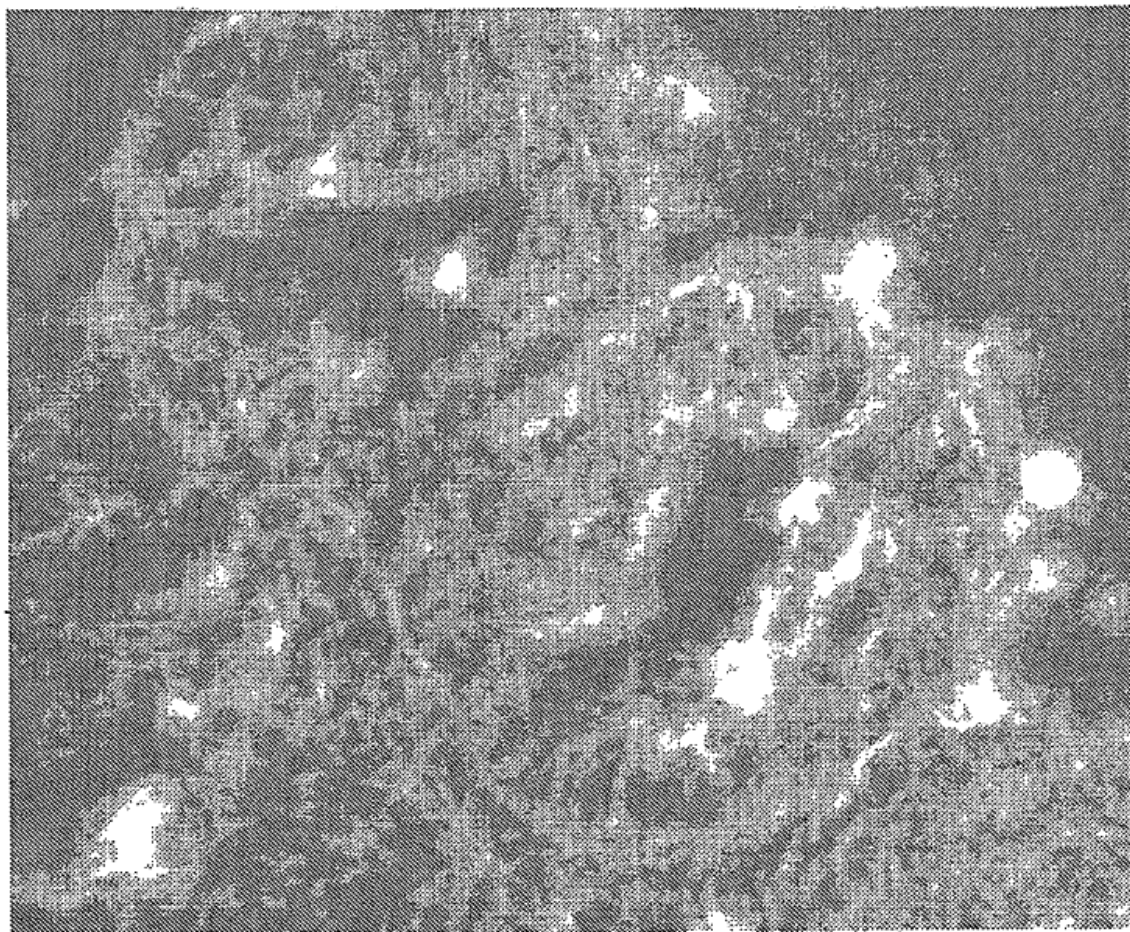


FIG. 7B



FIG. 7C

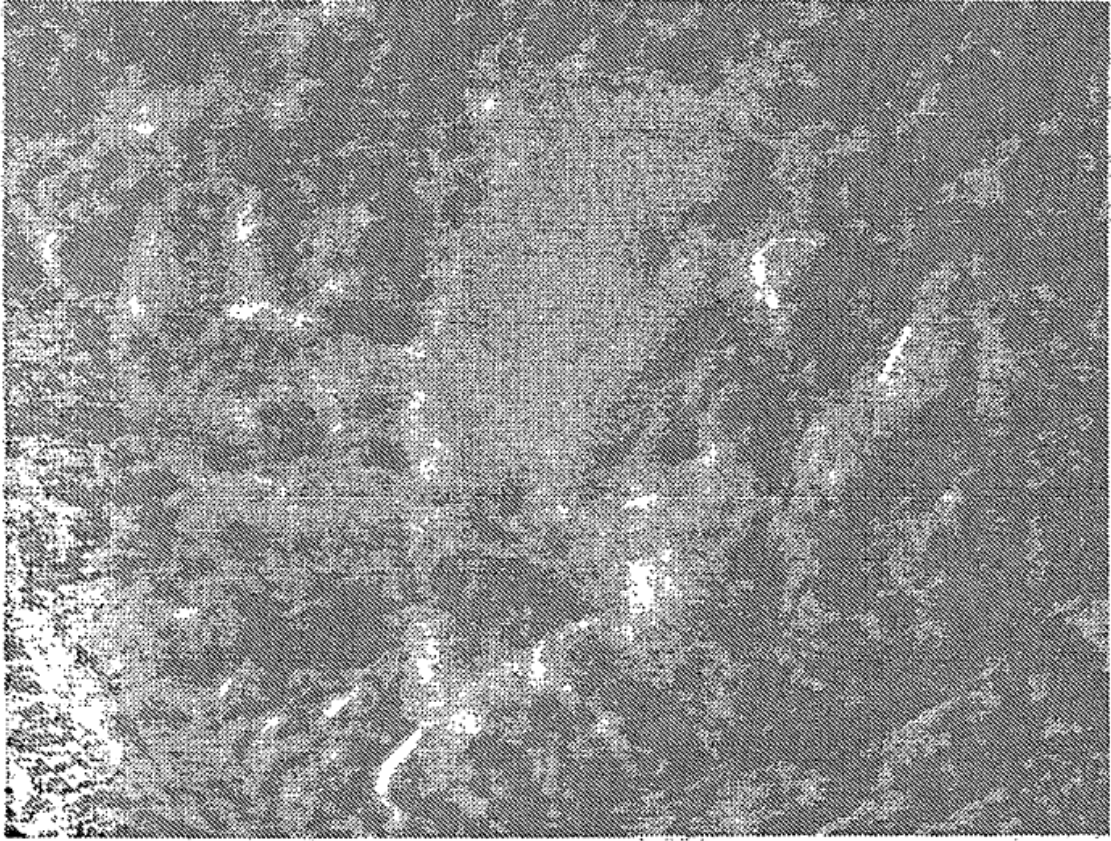


FIG. 7D

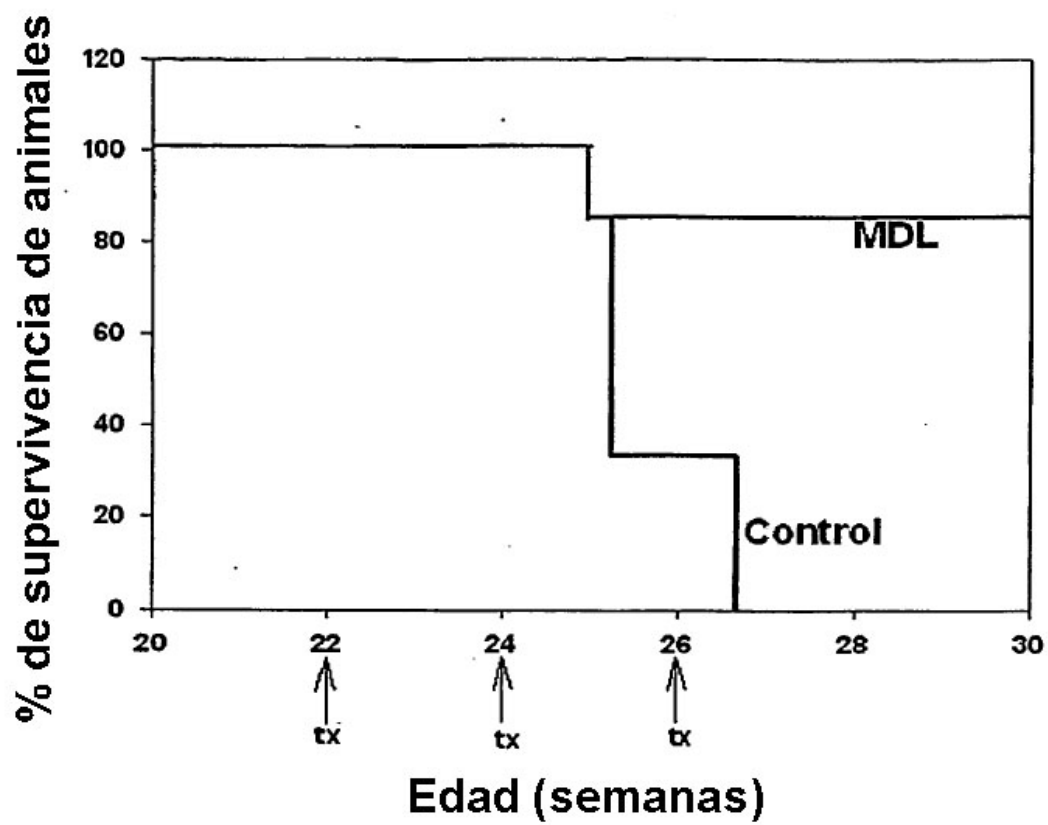


FIG. 8

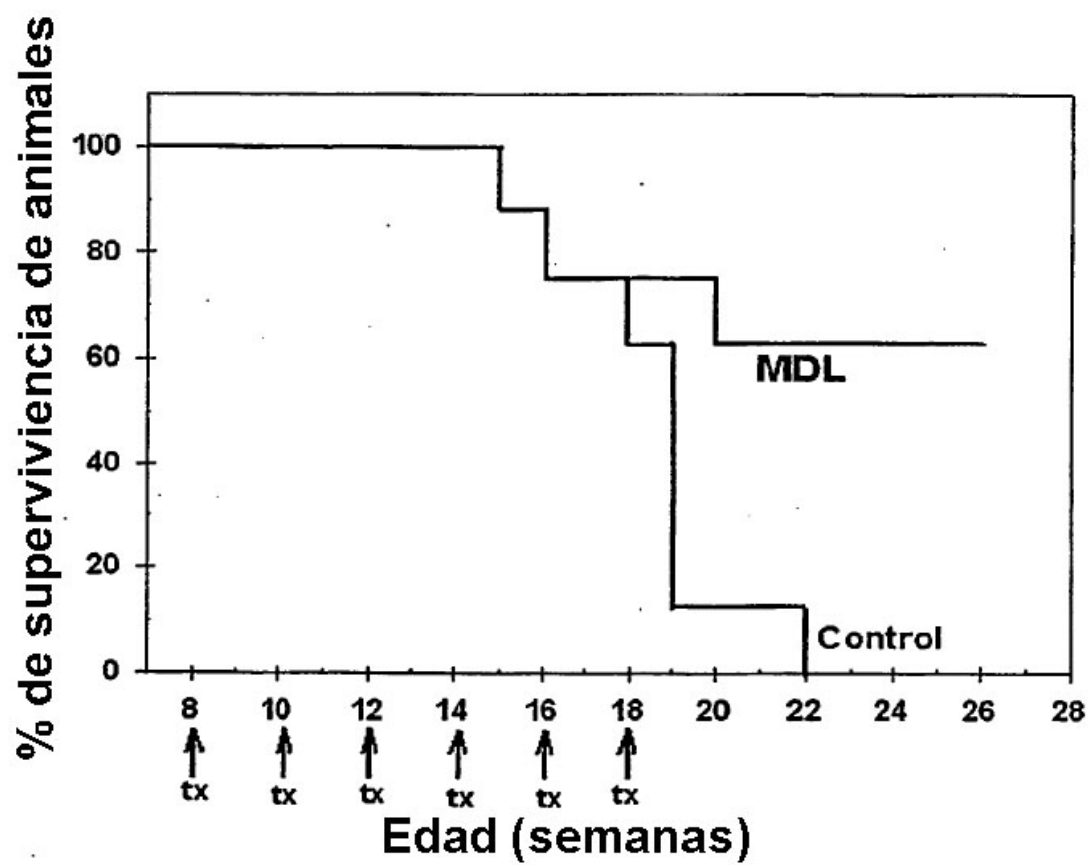
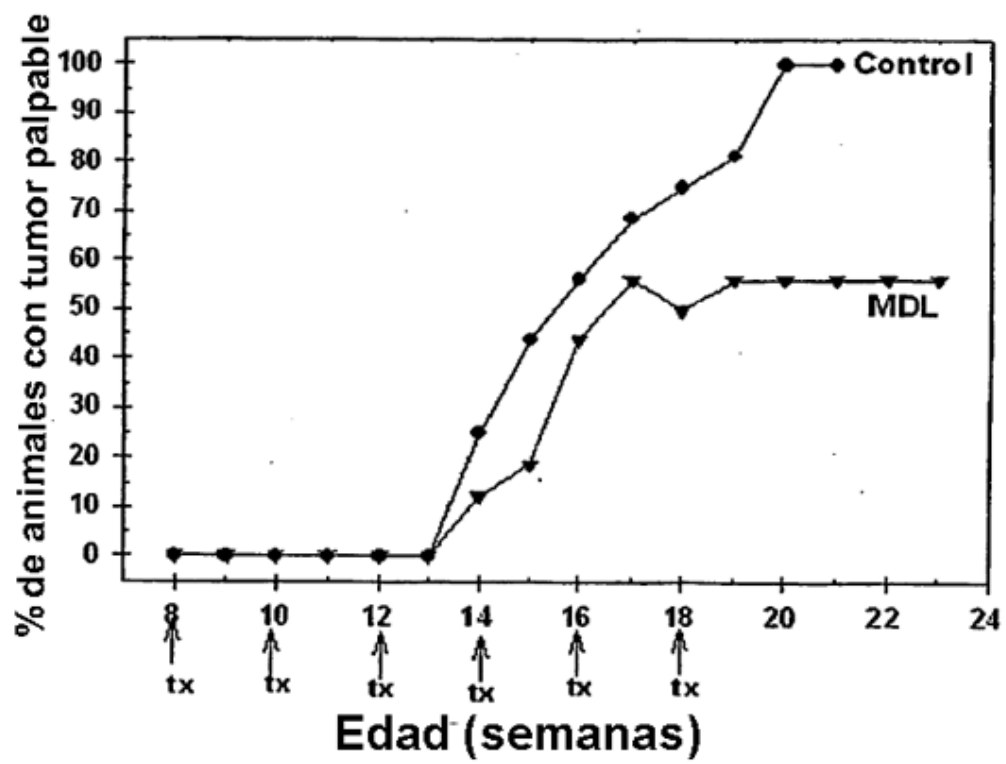


FIG. 9

FIG. 10

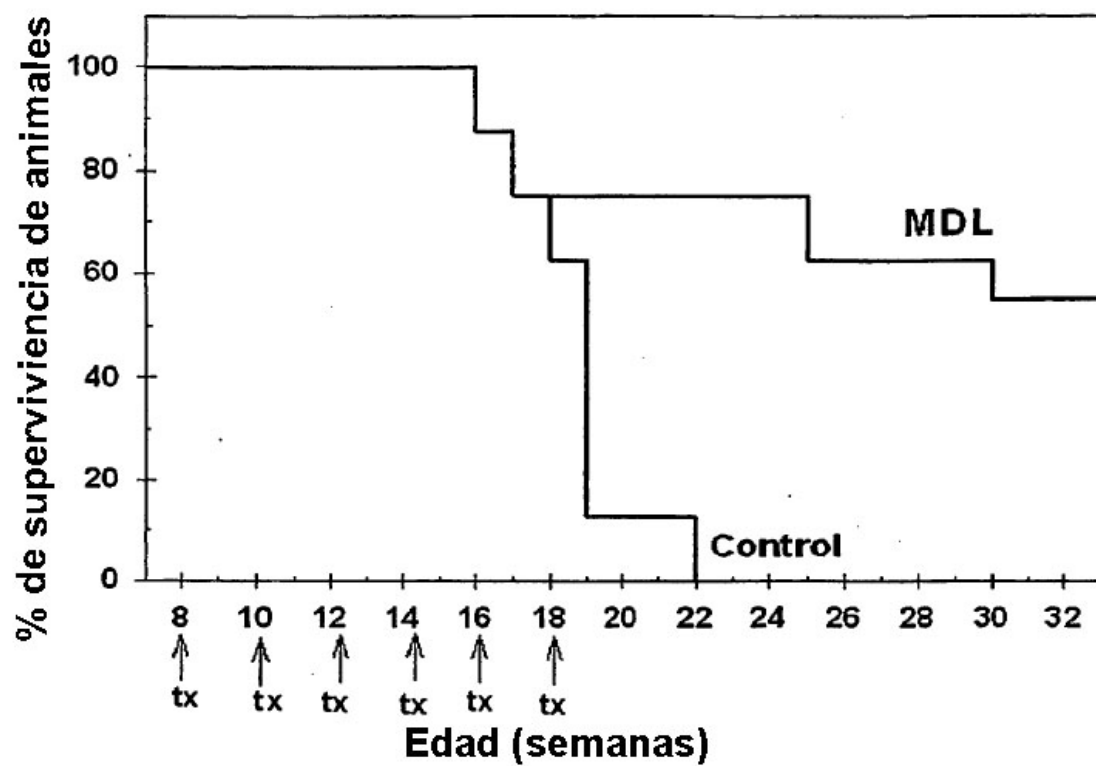


FIG. 11

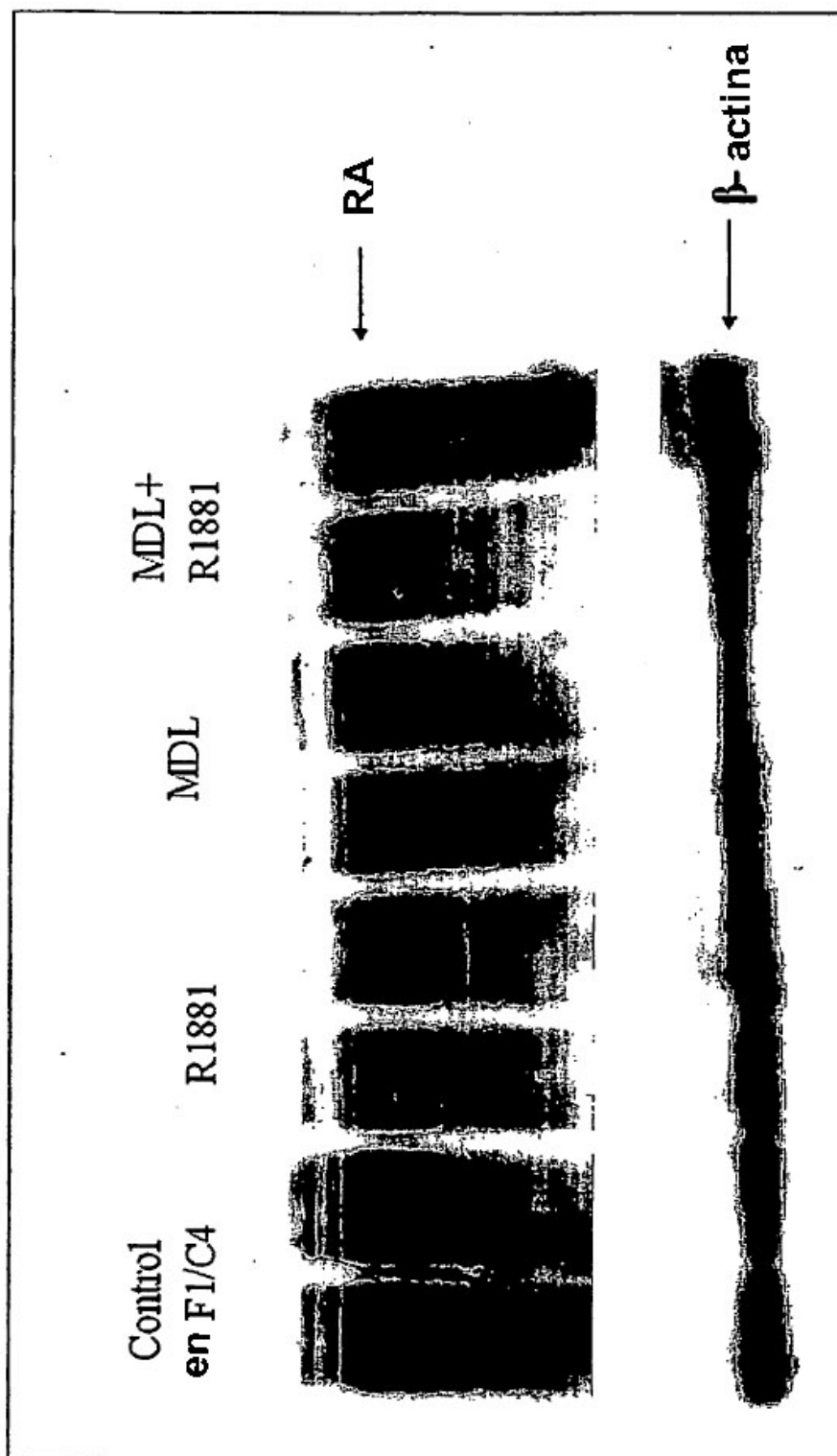


FIG. 12

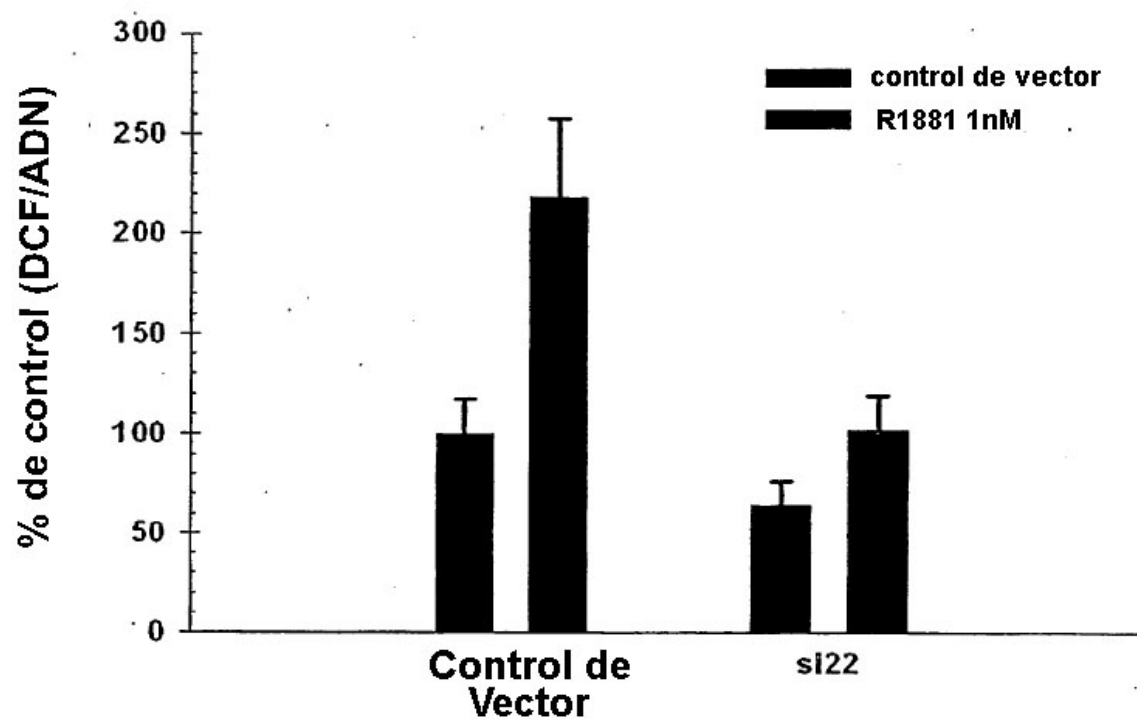


FIG. 13

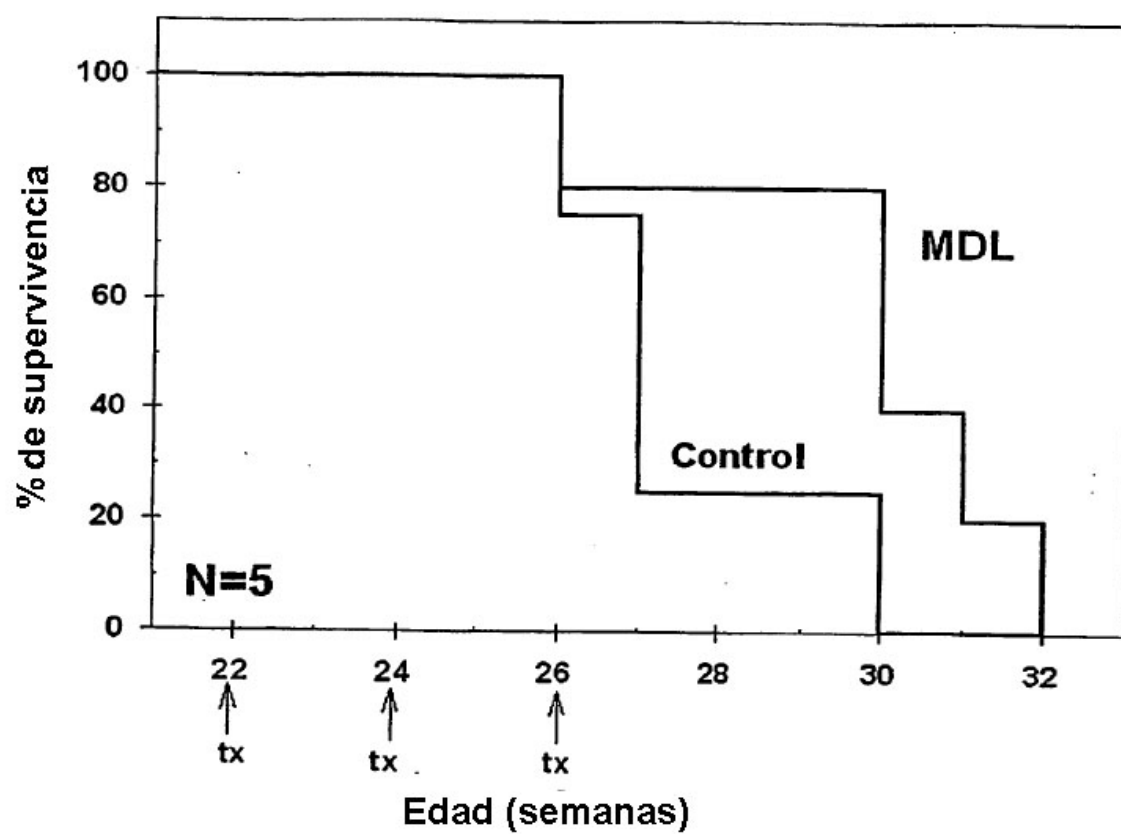


FIG. 14

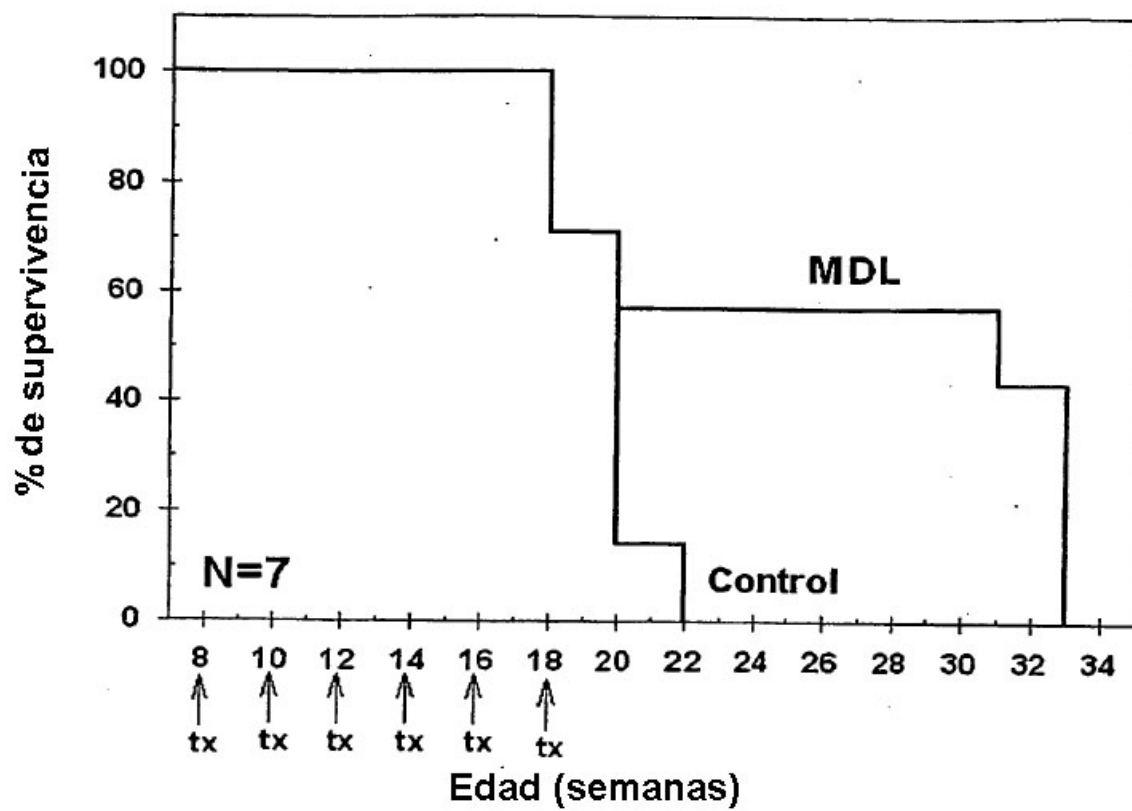


FIG. 15

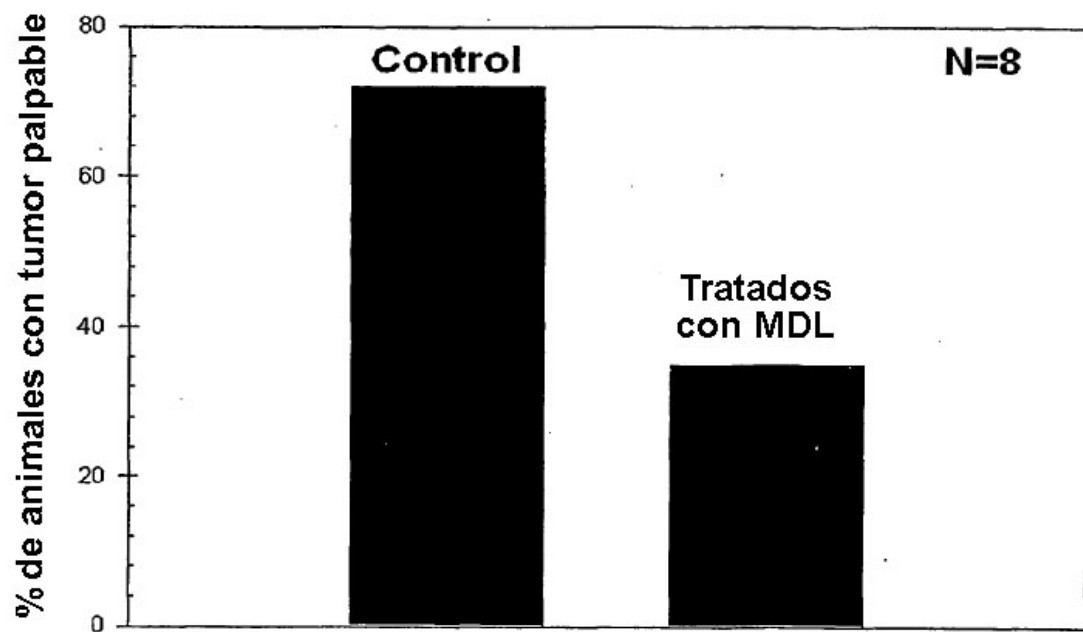


FIG. 16

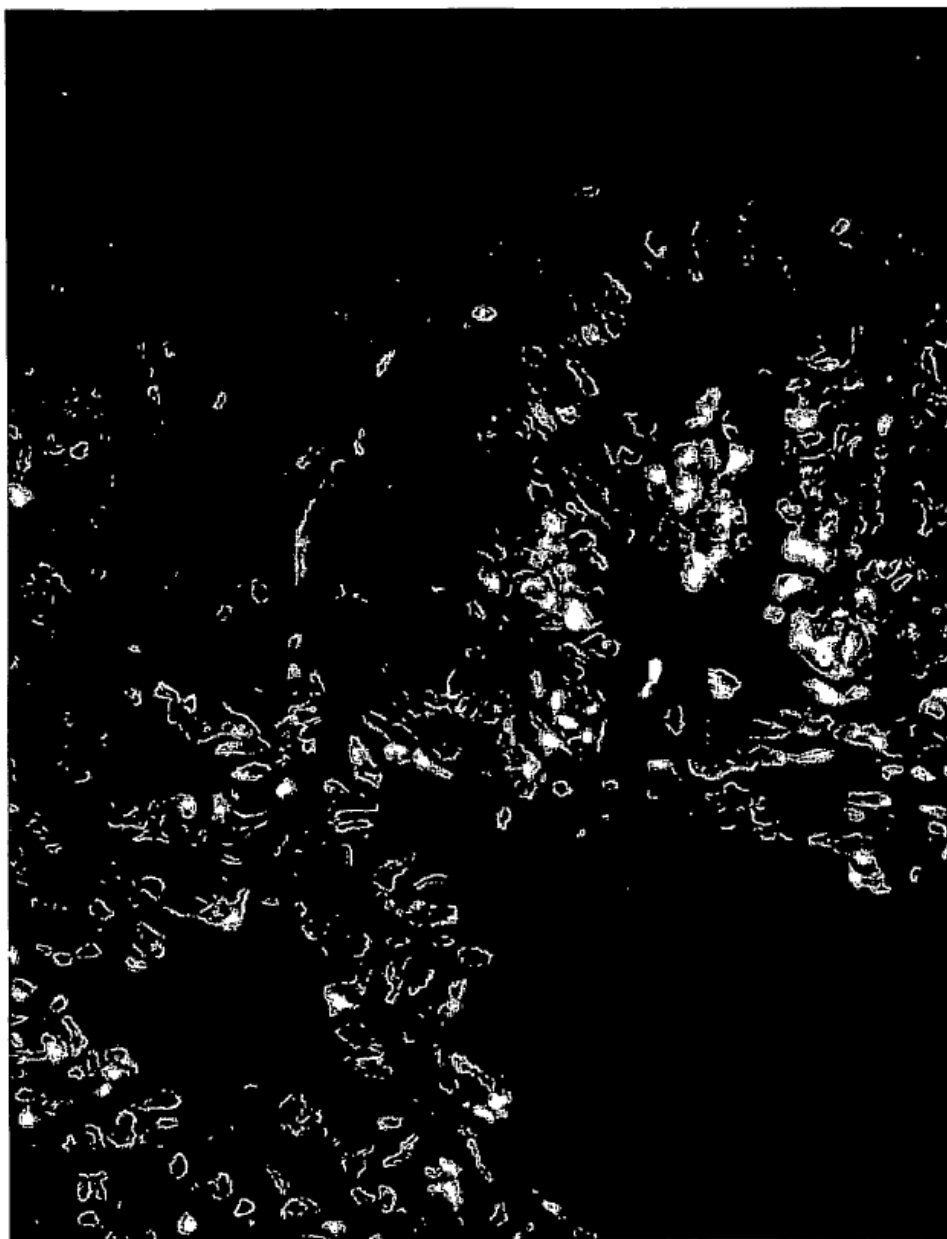


FIG. 17

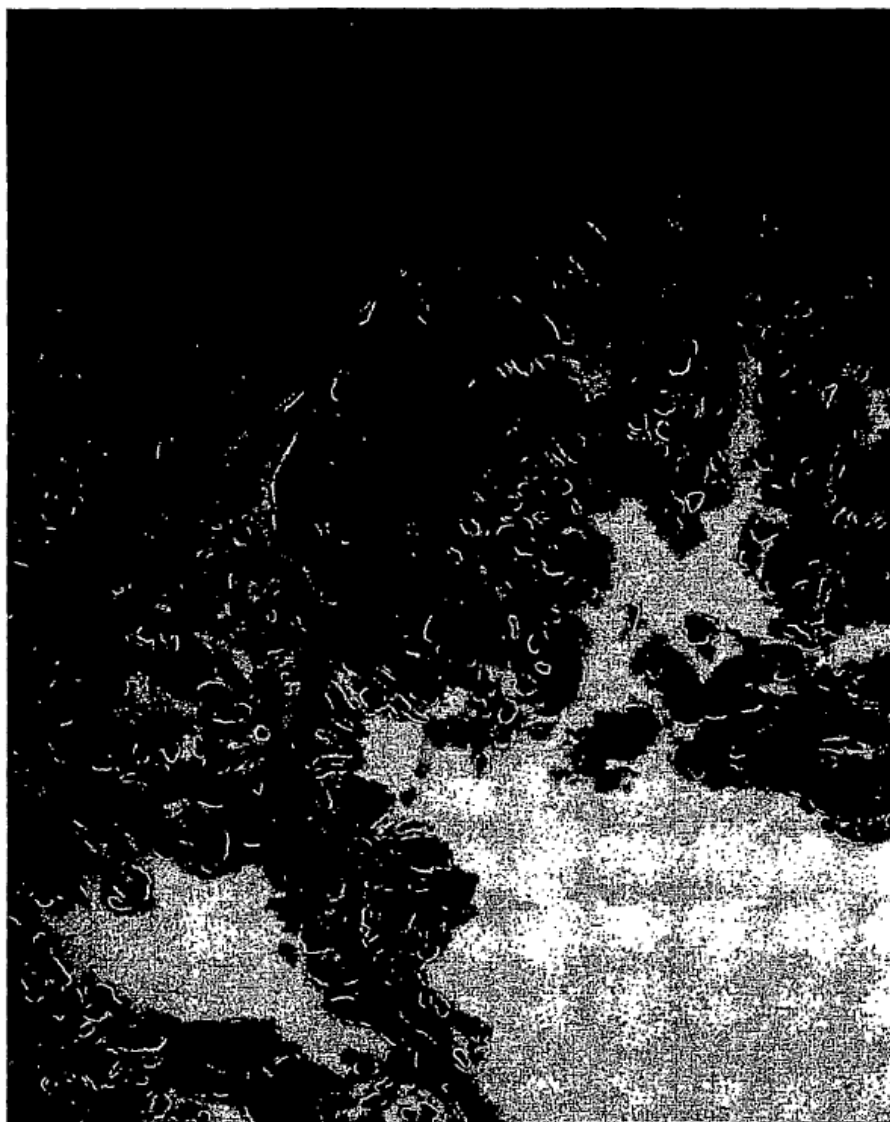


FIG. 18

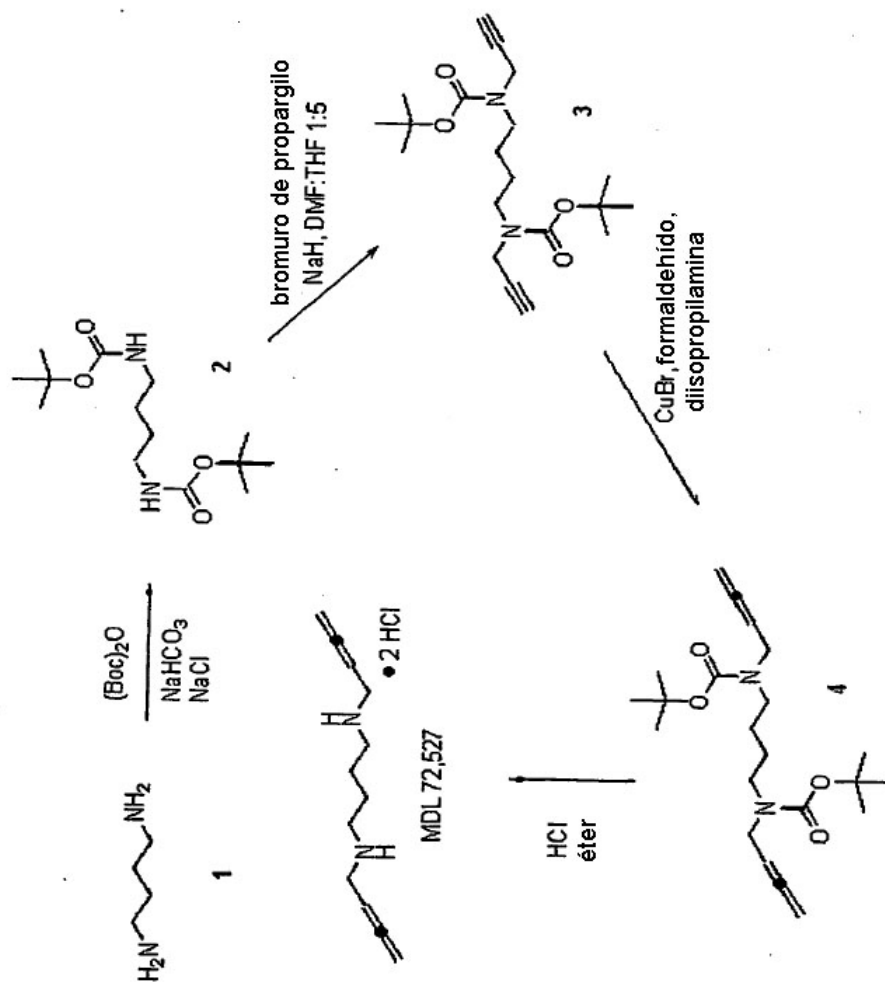


FIG. 19