

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 287**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/198</b>	(2006.01) <b>A61P 31/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/70</b>	(2006.01) <b>A61P 37/04</b>	(2006.01)
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)	
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)	
<b>A61K 47/26</b>	(2006.01)	
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)	
<b>A61P 35/04</b>	(2006.01)	
<b>A61P 39/00</b>	(2006.01)	
<b>A61P 17/02</b>	(2006.01)	
<b>A61P 29/02</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2003 E 03767028 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 1572093**

54 Título: **Tratamiento mejorado del cáncer con glutamina**

30 Prioridad:

**01.08.2002 US 400446 P**

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

**30.05.2013**

73 Titular/es:

**EISAI INC. (50.0%)  
100 TICE BOULEVARD  
WOODCLIFF LAKE, NJ 07677, US y  
BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF  
ARKANSAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KLIMBERG, V., SUZANNE;  
PETIT, ROBERT, G., II y  
SHINAL, EDWARD, C.**

74 Agente/Representante:

**ZUAZO ARALUZE, Alexander**

ES 2 405 287 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

Tratamiento mejorado del cáncer con glutamina

## 5 Antecedentes de la invención

La absorción de biomoléculas, tales como aminoácidos y proteínas, es crítica para la función celular. Aproximadamente el 75 por ciento de los sólidos en el cuerpo de los mamíferos son proteínas, incluyendo enzimas, polipéptidos tales como citocinas, nucleoproteínas, proteínas de transporte y proteínas estructurales. Los constituyentes funcionales principales de estas proteínas, los aminoácidos, polipéptidos y aminoácidos aislados, son también importantes para las funciones metabólicas celulares. El aminoácido glutamina, por ejemplo, sirve para funciones importantes en el metabolismo, incluyendo el transporte de carbono y nitrógeno entre tejidos. Es un precursor para la gluconeogénesis hepática y renal, así como para la síntesis de urea en el hígado y la producción de amonio en el riñón. Varios tipos de células, particularmente las células de la mucosa intestinal, también utilizan grandes cantidades de glutamina como su fuente principal de combustible respiratorio.

Se ha demostrado la eficacia de la complementación con aminoácidos para el tratamiento de una variedad de trastornos psicológicos. La complementación con D-serina, por ejemplo, aumenta los efectos beneficiosos de los antipsicóticos para el tratamiento de la esquizofrenia. (Tsai, G., *et al.*, *Biol. Psychiatry* (1998) 44(11): 1081-1089). Se ha mostrado que la complementación con L-triptófano o 5-hidroxitriptófano mejora los síntomas de depresión, ansiedad, insomnio y dolor en pacientes con fibromialgia. (Juhl, J.H., *Altern. Med. Rev.* (1998) 3(5): 367-375). La complementación de la dieta con 8 aminoácidos esenciales y 9 no esenciales proporcionó una salud, tono y estado de ánimo mejorados en pacientes de diálisis, en los que la malnutrición de proteínas es un problema común. (Mastroiacovo, P., *et al.*, *Clin. Ther.* (1993) 15(4): 698-704). También se ha sugerido la complementación nutricional con ácido aspártico para el tratamiento de la enfermedad de Canavan, un trastorno genético autosómico recesivo poco común que da como resultado muerte en el plazo de varios años de la aparición. (Baslow, M.H., *et al.*, *J. Mol. Neurosci.* (1997) 9(2): 109-125). También se ha demostrado que la L-lisina tiene uso terapéutico para lesiones asociadas con virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1). (Ayala, E. Y D. rokorian, *J. Med. Virol.* (1989) 28(1): 16-20).

Se ha mostrado que la complementación con glutamina proporciona numerosos beneficios, incluyendo la estimulación de determinadas células del sistema inmunitario y la promoción general del crecimiento celular. El agotamiento de la glutamina da como resultado atrofia de tejido epitelial, con translocación bacteriana asociada. La complementación clínica de glutamina reduce la atrofia epitelial y acelera la recuperación.

Se ha propuesto la complementación con glutamina de la dieta para el tratamiento de pacientes que se recuperan de una cirugía o que padecen septicemia, inflamación, quemaduras o traumatismos. La administración tópica, habitualmente en forma de una disolución de "engujar y tragar" para uso oral para reparar el tejido epitelial dañado de úlceras esofágicas o bucales, puede ser eficaz en muchos pacientes que se han sometido a trasplante de médula ósea o quimioterapia. (Skubitz, *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* (1996) 127(2): 223-8; Anderson, *et al.*, *Bone Marrow Transplant* (1998) 22(4): 339-44).

La complementación con glutamina puede ser beneficiosa para la terapia contra el cáncer por sus resultados tanto directos como indirectos. Se ha mostrado que la complementación con glutamina aumenta la liberación de glutatión a partir del intestino en ratas Fisher-344. (Cao, Y., *et al.*, *J. Parenter. Enteral Nutr.* (1998) 22(4): 224-227). Cuando se administra conjuntamente con o bien radiación o bien quimioterapia, se ha demostrado que la glutamina aumenta la selectividad de cualquier terapia para células tumorales. (Klimberg, N. y J. McClellan, *Am. J. Surg.* (1996) 172(5): 418-424). En un estudio, el crecimiento tumoral en ratas que recibieron glutamina, o bien mediante sonda nasogástrica o bien como aditivo alimenticio, disminuyó en un 40% en el plazo de tres semanas. (Fahr, M., *et al.*, *J. Parenter. Enteral Nutr.* (1994) 18(6): 471-476). En un estudio aparte, la pérdida de volumen tumoral en ratas que recibieron metotrexato casi se dobló cuando se añadió glutamina a la dieta. (Klimberg, N., *et al.*, *J. Parenter. Enteral Nutr.* (1992) 16 (supl. 6): 83S-87S). La disminución del crecimiento tumoral en ratas con complementación de glutamina se ha correlacionado con mayor actividad de células citotóxicas naturales, presumiblemente debido a la supresión mediada por glutatión de la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2). (Klimberg, N., *et al.*, *J. Surg. Res.* (1996) 63(1): 293-297).

Se describen formulaciones para la administración de aminoácidos, particularmente glutamina, en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 60/134.442 presentada el 17 de mayo de 1999.

La eficacia de la complementación con aminoácidos ha sido limitada en algunos individuos debido a envejecimiento o enfermedad. La complementación eficaz con determinados aminoácidos está limitada adicionalmente en grados variables por la baja solubilidad acuosa y captación celular limitada de algunos aminoácidos. La glutamina, por ejemplo, presenta una baja solubilidad en agua (48 g/l a 30°C, 26 g/l a 18°C, 18 g/l a 0°C; *The Merck Index*. 12ª edición) y una baja estabilidad química en disolución acuosa (11 días a 22-24°C). (Cardona, P., *Nutr. Hosp.* (1998) 13(1): 8-20).

El transporte de moléculas pequeñas al interior de diversos tipos de células está controlado por sistemas de

transporte alternos, lo que hace más difícil idear métodos para aumentar la captación celular al interior de tipos de células particulares. A pesar de la necesidad de métodos para potenciar la captación de aminoácidos y otras moléculas pequeñas, no se han descrito métodos para aumentar la absorción directa inicial de aminoácidos, péptidos y otros compuestos al interior de células tales como células epiteliales, el tipo de células inicialmente responsables de la captación inicial de muchos compuestos bioactivos.

Por tanto, existe una necesidad continuada de aumentar la captación celular de compuestos bioactivos al interior de células de mamíferos.

El cáncer es la segunda causa de muerte en los Estados Unidos. Hay una necesidad de prevenir y tratar cánceres en general y tipos particulares de cáncer, tales como cáncer de mama.

Las herramientas principales para el tratamiento del cáncer son radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, estas herramientas a menudo no pueden detener o revertir la progresión del cáncer. Además, tanto la quimioterapia como la radiación tienen efectos secundarios que limitan la calidad de vida para los pacientes con cáncer y a menudo requieren acortar el tratamiento.

Por tanto, existe una necesidad continuada de tratar el cáncer, potenciar la eficacia de tratamientos actuales para el cáncer, prevenir la recidiva y metástasis del cáncer y aliviar los efectos secundarios de la quimioterapia y radioterapia.

El documento WO 00/69470 da a conocer que la complementación con glutamina puede ser beneficiosa para la terapia contra el cáncer, entre otros en combinación con el agente quimioterápico metotrexato.

## Sumario

Se describen métodos de prevención de diversos estados, particularmente cáncer y estados asociados con el tratamiento del cáncer, mediante la administración de glutamina. Una realización de la invención proporciona el uso de glutamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la preparación de un medicamento para la prevención de la metástasis en un sujeto mamífero aquejado de cáncer. Otras realizaciones de la invención proporcionan el uso en la prevención de recidiva del cáncer y el uso en la inhibición de la aparición de cáncer en un mamífero.

Se ha encontrado inesperadamente que la eficacia de la glutamina en estas aplicaciones puede potenciarse mediante la administración conjunta de una cantidad eficaz de un hidrato de carbono, tal como un sacárido.

Se sabe que varias proteínas promueven o inhiben la proliferación de células cancerígenas, o alternativamente la apoptosis (muerte celular programada). Los inventores han descubierto que la administración de glutamina aumenta los niveles de proteínas proapoptóticas tales como Bad, Bax, p21 y caspasa-3, y disminuye los niveles de proteínas que son antiapoptóticas o promueven la proliferación de células cancerígenas, tales como Bcl-2, IGF-1, IGF-1R y Akt.

La invención proporciona el uso de una composición para aumentar la captación celular en células de tejido de mamífero. La composición es una disolución, dispersión o suspensión que comprende un vehículo acuoso y una cantidad eficaz de glutamina, en combinación con una cantidad de hidrato de carbono eficaz para lograr el aumento del transporte (absorción) de la glutamina al interior de las células diana *in vivo* o *in vitro*. El transporte (absorción) aumenta con respecto a la cantidad que entraría en las células en condiciones fisiológicas, es decir, en condiciones homeostáticas, cuando las células entran en contacto con la glutamina disuelta o suspendida en agua o en una disolución salina fisiológica. Preferiblemente, el transporte (absorción) aumenta en un factor de al menos aproximadamente 100-2000 veces el que puede obtenerse empleando una disolución acuosa sobresaturada del agente activo. El mecanismo por el que el hidrato de carbono potencia la captación de moléculas pequeñas en células de mamífero *in vitro* o *in vivo* es desconocido.

El portador de hidrato de carbono puede comprender un monosacárido, tal como glucosa, un disacárido, tal como sacarosa o una combinación de monosacáridos y disacáridos. El portador de hidrato de carbono puede comprender también un alcohol de azúcar tal como manitol, sorbitol o xilitol. El portador de hidrato de carbono puede comprender también un polisacárido tal como jarabe de maíz con alto contenido en fructosa o sólidos de jarabe de maíz, en donde el jarabe de maíz o los sólidos de jarabe de maíz, hidratados o anhidros, constituyen una fase de disolución para el/los agente(s) activo(s). El portador puede combinarse con agua o con una mezcla de agua con alcoholes, alquilenglicoles o polioles farmacéuticamente aceptables tales como glicerol, para formar una disolución. Preferiblemente los disolventes orgánicos constituyen una proporción menor de la fase acuosa, preferiblemente  $\leq 5-10\%$  en volumen.

La disolución puede ser una disolución verdadera o una "disolución sólida" fluida. Puede administrarse mediante una variedad de medios para la administración de líquidos, incluyendo pasta de dientes, goma de mascar, cápsulas de gelatina duras o blandas, supositorios, enemas, colutorios u otras formas de dosificación líquidas tales como

lociones aplicadas por vía tópica, o bebidas, tales como un batido.

También se proporcionan composiciones de dosificación farmacéuticas, que consisten en formulaciones secas o líquidas premezcladas, o bien envasadas a granel o bien envasadas individualmente, de una dosis terapéuticamente eficaz de un aminoácido tal como glutamina en mezcla con una cantidad de portador de hidrato de carbono eficaz para lograr un aumento de la absorción del aminoácido en células epiteliales. También pueden proporcionarse kits que comprenden, envasados por separado en un recipiente, formulación/formulaciones seca(s) y vehículo(s) acuoso(s) medido(s) previamente.

#### 10 **Breve descripción de los dibujos.**

La figura 1 y la figura 2 son gráficos que ilustran el aumento de la captación de aminoácidos logrado usando una composición de la invención. Se administró el aminoácido glutamina a células CaCo en combinación con una cantidad eficaz de portador de hidrato de carbono (razón de portador de carbono con respecto a aminoácido de 7:1) (Aesgen-14), con aminoácido administrado como una disolución saturada sin componentes adicionales (dis. sat. de L-glut.) como control. Tal como se indica mediante la leyenda de la figura y el gráfico, la concentración de glutamina intracelular aumentó significativamente en células tratadas con una combinación de aminoácido y portador de hidrato de carbono, en comparación con la lograda mediante la administración de glutamina sola. El tiempo de incubación en segundos se indica en el eje X, con la captación celular de glutamina en el eje Y.

La figura 3 muestra el flujo de glutamina intestinal (panel A) y flujo de glutatión intestinal (panel B) de ratas tratadas con DMBA+GLN (AES-14), DMBA+Freemine, aceite+GLN (AES-14), y aceite+Freemine.

La figura 4 muestra la concentración de IGF-1 sérica en ratas 1-11 semanas después de la alimentación por sonda con aceite de sésamo, tratadas después de la alimentación por sonda con aceite con AES-14 (GLN) oral, Freemine isonitrogenada (FA), o agua.

La figura 5 muestra la concentración de IGF-1 sérica en ratas 1-11 semanas después de la alimentación por sonda con DMBA en aceite de sésamo, tratadas después de la alimentación por sonda con DMBA con AES-14 (GLN) oral, Freemine isonitrogenada (FA), o agua.

La figura 6 muestra el efecto de la complementación con GLN (AES-14) sobre los niveles tumorales de GSH (panel A) y GSSG (panel B) en cáncer de mama inducido por DMBA experimental. Se realizaron mediciones por triplicado. Los resultados se expresan como nmol/mg de proteína mostrándose las barras de error estándar.

La figura 7 muestra el efecto de la complementación con GLN (AES-14) sobre la actividad enzimática de caspasa-3 de tumores de glándula mamaria inducidos por DMBA. Los resultados se expresan como absorbancia a 405 nm mostrándose las barras de error estándar. Se realizaron mediciones por triplicado.

La figura 8 muestra el efecto de la complementación con GLN (AES-14) sobre la expresión de ARNm de Bcl-2, Bax, caspasa-3 y p21 en tumores mamarios de ratas tratadas con DMBA tal como se establece mediante RT-PCR relativa. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias mostrándose las barras de error estándar. Se presenta debajo de cada columna una fotografía del gel de agarosa invertido representativo (n = 5).

La figura 9 muestra la inhibición de la expresión de proteína de IGF-1 en tejido de mama no tumoral mediante la complementación con GLN (AES-14) en el modelo de cáncer de mama por DMBA.

La figura 10 muestra el efecto de GLN (AES-14) en la dieta sobre la expresión de proteína de IGF-1R en cáncer de mama inducido por DMBA experimental.

La figura 11 muestra el efecto inhibitorio de la complementación con GLN (AES-14) en la dieta sobre la expresión de proteína Akt en cáncer de mama experimental de ratas.

La figura 12 muestra la reducción de la expresión de proteína Bcl-2 en muestras de tejido no tumoral de ratas con cáncer de mama inducido por DMBA experimental.

La figura 13 muestra el efecto de la complementación con GLN sobre la expresión de proteína Bad en el modelo de cáncer de mama inducido por DMBA.

La figura 14 muestra el efecto de la ingestión de DMBA sobre el transporte de glutatión (GSH) medido en vesículas de la membrana basolateral de yeyuno de rata.

La figura 15 muestra la concentración de glutatión (GSH) en sangre portal de ratas 1 semana después de la ingestión de DMBA o aceite de sésamo (control).

La figura 16 muestra el efecto de la ingestión de DMBA sobre la concentración de glutatión (GSH) en mucosa intestinal de rata.

5 La figura 17 muestra la actividad gama-glutamil transpeptidasa (GT) de tejidos mucosos de ratas alimentadas con aceite de sésamo y los tejidos mucosos y tumorales de ratas alimentadas por sonda con DMBA.

La figura 18 muestra la actividad gama-glutamilcisteína sintetasa de tejidos mucosos de ratas alimentadas con aceite de sésamo y los tejidos mucosos y tumorales de ratas alimentadas por sonda con DMBA.

10 La figura 19 muestra la actividad celular citotóxica natural de células NK muestreadas de ratas 1-11 semanas después de la alimentación por sonda con DMBA en aceite de sésamo o aceite de sésamo control (aceite) y a las que se les administró por vía oral durante el período de estudio tras la alimentación por sonda AES-14 (GLN), Freamine (FA), o agua.

15 Descripción detallada de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones. Los inventores han descubierto una composición que aumenta la captación celular de agentes bioactivos en células de mamífero *in vitro* o *in vivo*. Usando la composición, se ha demostrado un aumento de la captación en células epiteliales gastrointestinales del aminoácido glutamina en un factor de aproximadamente 150X o más en diez segundos tras la administración.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “agente bioactivo” se refiere a una molécula que ejerce un efecto terapéutico o nutritivo en un mamífero tras la absorción de una cantidad eficaz de la molécula por las células diana.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad que provoca un cambio biológico detectable en una población de células diana, y preferiblemente una cantidad que logra un efecto terapéutico, es decir, reduce al menos un síntoma de una patología o enfermedad que aqueja al mamífero.

30 Tal como se usa en el presente documento, “aminoácido” incluye, por ejemplo, alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, citrulina, ácido g-aminobutírico, hidroxiprolina, y ornitina, así como dipéptidos tales como glutamilglutamato y tripéptidos tales como glutatión. (Véase Remington’s Pharmaceutical Sciences (19<sup>a</sup> ed.), páginas 389-392). Sin embargo, la composición y el método son particularmente  
35 útiles para aumentar la absorción de aquellos aminoácidos que presentan solubilidad acuosa limitada y/o escasa captación celular, tales como glutamina. Solubilidad acuosa limitada, tal como se usa en el presente documento, se define como una solubilidad de menos de aproximadamente 5 gramos de aminoácido en 100 ml de agua a 22-25°C.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “glutamina” incluye glutamina (5-amida del ácido glutámico). Pueden emplearse también sales de glutamina farmacéuticamente aceptables en los presentes métodos, incluyendo las sales de adición de ácido de aminas, tales como clorhidratos, acetatos, tartratos, citratos, y similares, y sales de carboxilato, tales como sales de sodio y potasio. El peso de glutamina o razón en peso de glutamina con respecto a otros componentes, en el contexto de una sal de glutamina, se refiere al peso de la parte de glutamina de una sal de glutamina. Por ejemplo, puesto que el peso molecular de la glutamina de sodio es 168 y el peso fórmula de la  
45 glutamina es 146, una composición que contiene 1 gramo de glutamina de sodio se consideraría que contiene 0,87 gramos de glutamina.

Las presentes disoluciones pueden potenciar también la absorción celular *in vitro* o *in vivo* de una amplia variedad de agentes bioactivos, preferiblemente en cantidades terapéuticas, particularmente de las entidades generalmente denominadas “moléculas pequeñas”.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “molécula pequeña” incluye entidades moleculares individuales tales como aminoácidos, esteroides, citocinas, hormonas, reguladores hormonales, enzimas, vitaminas y similares que generalmente tienen un peso molecular de menos de 30 kD, preferiblemente menos de 25 kD, lo más preferiblemente menos de 10 kD, es decir, un peso molecular de  $\leq$  5000 daltons.

Tal como se usa en el presente documento, el término “oligopéptido” es un péptido compuesto por de 2 a 20 aminoácidos.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “índice terapéutico” se refiere a la razón de destrucción de células cancerosas con respecto a la destrucción de células normales que no son diana mediante quimioterapia o radioterapia.

65 Tal como se usa en el presente documento, “actividad celular citotóxica natural” se refiere a la actividad de destrucción celular de células citotóxicas naturales. Esto puede medirse, por ejemplo, en un ensayo de citotoxicidad tal como el descrito en el ejemplo 10 más abajo.

La absorción potenciada de agentes bioactivos en la piel o tejido mucoso intacto del intestino puede usarse también para administrar agentes bioactivos que tienen un efecto sobre órganos o tejidos alejados del sitio de administración.

5 “Hidrato de carbono”, tal como se usa en el presente documento, incluye los azúcares conocidos como monosacáridos y disacáridos, polioles, análogos de hidroxilo o alcoholes de azúcar, tales como, por ejemplo, xilitol, sorbitol y manitol, y sus polímeros, tales como dextrinas, jarabe de maíz con alto contenido en fructosa y sólidos de jarabe de maíz. Se conoce bien en la técnica que determinados mono y disacáridos forman alcoholes de azúcar o análogos de hidroxilo. Se ha comprobado que determinados de estos análogos de hidroxilo, particularmente sorbitol y xilitol, proporcionan el beneficio de un sabor azucarado sin las propiedades cariogénicas de los mono y disacáridos de los que se derivan.

15 El mecanismo por el que el hidrato de carbono potencia la captación de moléculas pequeñas en células de mamífero *in vitro* o *in vivo* es desconocido. En algunas realizaciones habrá una proporción en peso importante de hidrato de carbono en la composición final, por ejemplo, mayor del 80-90 por ciento en peso. En algunos casos, la composición puede estar esencialmente libre de agua añadida, es decir, puede ser una “disolución sólida”, actuando el hidrato de carbono como “disolvente” para el principio activo. Tales “disoluciones sólidas” pueden ser fluidas, semisólidas o incluso sólidas. La razón de hidrato de carbono con respecto a agente activo puede ser de 0,5:1 a 50:1. Puede ser, por ejemplo, de 1,5:1 p/p a 20:1 p/p en preparación seca y mayor de 4:1 p/v en disolución acuosa final, preferiblemente de 4:1 p/v a 15:1 p/v, lo más preferiblemente mayor de 7:1 p/v, lograda o bien mediante constitución de la preparación con disolvente acuoso o bien mediante administración al entorno acuoso de los fluidos extracelulares que rodean el tejido diana.

25 “Célula”, tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier célula con la que puede ponerse en contacto la presente composición según el presente método, tal como células epiteliales, células endoteliales, células de la piel, fibroblastos o células neuronales. Más específicamente, células en las que se ha demostrado que la composición y el método de la presente invención aumentan la absorción del aminoácido glutamina son células epiteliales gastrointestinales, incluyendo células de la boca, la garganta, el esófago, el estómago, los intestinos, el colon y el recto, células endoteliales y fibroblastos.

30 “Constitución con disolvente acuoso” tal como se usa en el presente documento, incluye constitución con agua, soluciones salinas fisiológicas o tampones, zumo de fruta u otro líquido que contiene un alto porcentaje de agua, o con fluidos extracelulares que rodean el tejido al que se aplica la composición, tal como saliva, moco, fluidos gástricos, líquido cefalorraquídeo y similares.

35 **Realizaciones de la invención**

Una realización de la invención proporciona el uso de glutamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la preparación de un medicamento para la prevención de la metástasis en un sujeto mamífero aquejado de cáncer. La composición puede incluir también hidrato de carbono en una cantidad eficaz para aumentar la absorción de glutamina por el sujeto.

45 Otra realización de la invención proporciona el uso de glutamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la preparación de un medicamento para la prevención de recidiva del cáncer en un sujeto mamífero en remisión del cáncer o que está sometiéndose a terapia anticancerígena. La composición puede incluir también hidrato de carbono en una cantidad eficaz para aumentar la absorción de glutamina por el sujeto.

50 Otra realización de la invención proporciona el uso de glutamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma e hidrato de carbono en la preparación de un medicamento oral para inhibir la aparición de cáncer en un sujeto mamífero en riesgo de desarrollar cáncer, en el que la razón en peso de hidrato de carbono total con respecto a glutamina en el medicamento es de 0,5:1 a 50:1.

55 En la invención, la cantidad de glutamina administrada al sujeto mamífero puede ser, por ejemplo, de al menos 0,5 mg/día/kg de masa corporal del sujeto o de 0,2 a 3,0 g/día/kg de masa corporal.

Incluir hidrato de carbono en las composiciones de glutamina potencia la absorción de glutamina por células de mamífero, permitiendo por tanto la administración de cantidades inferiores de glutamina. Por tanto, en realizaciones particulares de los métodos de la invención, la cantidad de glutamina administrada al sujeto es inferior a 0,5, inferior a 0,2, inferior a 0,1 o inferior a 0,05 g/día/kg de masa corporal del sujeto.

60 En realizaciones particulares de la invención, el hidrato de carbono comprende uno o más monosacáridos o disacáridos. En otras realizaciones, el hidrato de carbono comprende un alcohol de azúcar.

65 En realizaciones particulares, la razón en peso de hidrato de carbono total con respecto a glutamina en la composición es de 0,5:1 a 50:1.

En realizaciones particulares, la razón en peso de hidrato de carbono total con respecto a glutamina es de al menos 4:1 en una disolución acuosa, o bien tras su preparación con un disolvente acuoso o bien tras su administración en un entorno acuoso del sujeto mamífero.

5 En realizaciones particulares, la composición comprende no más de 5 aminoácidos que se producen de manera natural distintos de glutamina, no más de 3 aminoácidos que se producen de manera natural distintos de glutamina o ningún aminoácido que se produce de manera natural distinto de glutamina.

El sujeto mamífero puede ser un ser humano.

10 Las composiciones de la invención pueden administrarse también después o antes de tratar quirúrgicamente de cáncer al sujeto.

15 Las composiciones de la invención pueden administrarse también antes, después o durante el tratamiento del sujeto con un agente biológico anticancerígeno. Ejemplos de agentes biológicos incluyen proteínas tales como anticuerpos monoclonales, enzimas, o determinadas hormonas; interferón; células tales como macrófagos; u hormonas no proteicas.

20 Otra realización de la invención es el uso de glutamina para preparar un medicamento eficaz para prevenir metástasis en un sujeto mamífero aquejado de cáncer.

25 Otra realización de la invención es el uso de glutamina para preparar un medicamento eficaz para prevenir recidiva del cáncer, que comprende: preparar un medicamento que comprende glutamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde la administración oral del medicamento a un sujeto mamífero en remisión del cáncer o que está sometiéndose a terapia anticancerígena es eficaz para prevenir la recidiva del cáncer en el sujeto.

30 Otra realización de la invención es el uso de glutamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y al menos un hidrato de carbono para preparar un medicamento eficaz para prevenir la aparición de cáncer en un sujeto mamífero en riesgo de desarrollar cáncer, que comprende: preparar un medicamento en el que la razón en peso de hidrato de carbono total con respecto a glutamina en el medicamento es de 0,5:1 a 50:1

Formulación de una composición para aumentar la solubilidad y la absorción de un aminoácido.

35 Según la presente invención, se combina al menos un agente bioactivo con un hidrato de carbono en presencia de agua, de modo que se forma una disolución acuosa. El hidrato de carbono puede ser, por ejemplo, un monosacárido, incluyendo, por ejemplo, alosa, altrosa, arabinosa, dihidroxiacetona, eritrosa, eritrolosa, fructosa, galactosa, glucosa, gliceraldehído, gulosa, lixosa, idosa, manosa, psicosa, ribosa, ribulosa, sorbitol, tagatosa, treosa, xilosa, xilulosa, y sus análogos de hidroxilo respectivos, tales como sorbitol a partir de sorbosa, manitol a partir de manosa y xilitol a partir de xilosa. Alternativamente, el hidrato de carbono puede ser un disacárido, tal como maltosa o sacarosa, o ambos, o sus polímeros, tales como dextrinas, maltodextrinas y productos de jarabe de maíz con alto contenido en fructosa. El portador de hidrato de carbono puede estar compuesto también por cualquier combinación de monosacáridos, disacáridos o ambos, o de otros hidratos de carbono. Para muchas aplicaciones, es preferible el análogo de hidroxilo del azúcar, particularmente cuando se necesita un azúcar no cariogénico. Los ejemplos de análogos de hidroxilo incluyen los alcoholes de azúcar, xilitol, sorbitol, y manitol.

45 La concentración de hidrato de carbono, medida como peso/volumen, en la composición sólida es preferiblemente del 20% al 99%. A una determinada concentración, el hidrato de carbono se complejará y reducirá la cantidad de agua libre disponible como soluto para el agente activo, de modo que el transporte del agente activo al interior de la célula diana aumenta significativamente.

50 Una realización preferida de la composición proporciona una mezcla de sólidos que incluye aproximadamente un 5-50% p/p de glutamina (lo más preferiblemente L-glutamina), aproximadamente un 15-50% p/p de portadores de hidrato de carbono, incluyendo un disacárido (lo más preferiblemente sacarosa), un poliol o alcohol de azúcar (lo más preferiblemente sorbitol) y glicerina, una cantidad eficaz de tampón o compuesto de tamponamiento (lo más preferiblemente fosfato de sodio monobásico anhidro), aproximadamente un 1-5% p/p de celulosa modificada (lo más preferiblemente gel de celulosa Avicel<sup>®</sup>), comprendiendo el resto opcionalmente agentes emulsionantes y estabilizadores (goma xantana, carragenanos), conservantes (metilparabeno, sorbato de potasio), un antiespumante (simeticona), y aromatizante.

60 Una realización más preferida proporciona aproximadamente un 5-15% p/p de glutamina, un 30-50% p/p de portadores de hidrato de carbono, incluyendo un disacárido (lo más preferiblemente sacarosa), un poliol o alcohol de azúcar (lo más preferiblemente sorbitol) y glicerina, comprendiendo el resto de sólidos secos una cantidad eficaz de un tampón o compuesto de tamponamiento (lo más preferiblemente fosfato de sodio monobásico anhidro), celulosa modificada (lo más preferiblemente gel de celulosa Avicel<sup>®</sup>), y comprendiendo opcionalmente estabilizadores y emulsionantes (goma xantana, carragenanos), conservantes (metilparabeno, sorbato de potasio), antiespumantes (simeticona) y aromatizante.

65

Una composición líquida preferida proporciona un 5-25% p/v de L-glutamina, un 20-40% p/v de portador de hidrato de carbono, incluyendo un disacárido, un alcohol de azúcar y glicerina, un 5-10% p/v de ácido cítrico y una cantidad eficaz de tampón (preferiblemente fosfato de sodio al 0,4-0,8%), y el resto agua o alcohol-agua, con estabilizadores, conservantes, emulsionantes y aromatizantes opcionales.

El uso de un portador de hidrato de carbono en la composición puede aumentar la absorción celular del aminoácido en al menos diez veces con respecto a la administración directa del aminoácido en agua. Por ejemplo, una composición acuosa preferida de un 38% p/v de L-glutamina, un 30% p/v de sacarosa y un 2,8% p/v de sorbitol produjo un aumento de 360 veces en la captación de glutamina por células CaCo (una línea celular de mucosa epitelial) con respecto a la obtenida mediante el uso de una disolución acuosa de glutamina sola.

Pueden añadirse también excipientes a la composición, siempre que se mantenga la concentración necesaria de portador de hidrato de carbono. Estos pueden incluir un edulcorante/disolvente, tal como glicerina; agentes emulsionantes y estabilizadores, tales como gel de celulosa (por ejemplo, gel de celulosa microcristalina Avicel® (FMC Corp., Filadelfia, Pennsylvania)), goma xantana o carragenanos; conservantes y estabilizadores, tales como ácido cítrico, y metilparabeno; un componente antiespumante/base, tal como simeticona; aromatizante u otros componentes que mejoran la estabilidad y administración de la composición.

Administración de una concentración aumentada de un agente activo

Puede proporcionarse la administración de concentraciones aumentadas de agente activo a células diana *in vivo* o *in vitro* por varias rutas alternativas. Por ejemplo, el agente activo puede mezclarse con un hidrato de carbono y agua, y opcionalmente agentes gelificantes o espesantes. La mezcla puede administrarse como una disolución, un gel o una suspensión. Si se desea, pueden eliminarse materiales no disueltos dejando que la mezcla repose para permitir que las partículas no disueltas se depositen, o puede centrifugarse para aislar el sobrenadante. La disolución de sobrenadante puede aplicarse entonces por vía parenteral o por vía oral al tejido diana, tal como mediante inyección intravenosa de infusión.

La glutamina y las composiciones de la invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un huésped mamífero, tal como un paciente humano en una variedad de formas adaptadas a la vía de administración elegida, por ejemplo, por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, por vía tópica o por vía enteral), o por vía oral. Pueden administrarse también por vías intramuscular, tópica o subcutánea, o mediante administración directa al tubo digestivo, por ejemplo, mediante enema o supositorio. Preferiblemente, se administra por vía oral.

La aplicación de la preparación puede incluir, pero no se limita a, la administración tópica mediante frotis directamente sobre una herida que resulta de, por ejemplo, una quemadura, un traumatismo o una infección viral, por ejemplo, en forma de ungüento, gel o líquida, incluyendo administración mediante parches transdérmicos. Las composiciones de la invención pueden administrarse por vía oral. La preparación puede aplicarse a lesiones orales, nasales y esofágicas mediante enjuague oral, un gel o una bebida ingerible. Tanto para enjuague oral como bebida ingerible, el portador de hidrato de carbono puede elegirse de entre varios monosacáridos, disacáridos o una combinación de ambos, o de sus polímeros, tales como dextrinas, maltodextrinas y productos de jarabe de maíz con alto contenido en fructosa. Los portadores de hidratos de carbono preferidos incluyen sacarosa, sorbitol y productos de jarabe de maíz con alto contenido en fructosa. Puede proporcionarse o bien una suspensión o bien una bebida como una mezcla seca de portador de hidrato de carbono y una cantidad eficaz de aminoácido, para su reconstitución con agua, zumo, u otro líquido. Puede proporcionarse envasado a granel de la mezcla seca o envases que contienen aplicaciones individuales a un paciente, profesional sanitario o cualquier individuo para el que se desee la administración de una concentración aumentada de agente activo. Antes de la administración, la preparación puede constituirse con agua, zumo u otro líquido para proporcionar una fácil administración y aumentar la absorción de glutamina en el tejido epitelial. Pueden emplearse también formas farmacéuticas unitarias o a granel líquidas premezcladas.

La aplicación de la composición que tiene una concentración relativamente baja de agua libre puede lograrse también proporcionando una pastilla para chupar o una forma de caramelo u otro dulce medicado, tal como una piruleta común, que utiliza un portador de hidrato de carbono adecuado, tal como sacarosa o sorbitol, y un agente gelificante o espesante, según se necesite. Puede usarse también goma de mascar para administrar el portador de hidrato de carbono, tal como sacarosa, xilitol, sorbitol o sólidos de jarabe de maíz, y aminoácido. En una forma preferida, la goma de mascar puede incorporar una cavidad central de jarabe aromatizado, compuesto por la mezcla apropiada de portador de hidrato de carbono, tal como xilosa, sorbitol o sacarosa, y una cantidad eficaz del aminoácido. Se describen formulaciones para la preparación de goma de mascar con una parte de núcleo blando en la patente estadounidense n.º 4.352.823 (Cherukuri, *et al.*, 5 de octubre de 1982) y la patente estadounidense n.º 4.352.825 (Cherukuri, *et al.*, 5 de octubre de 1982). Alternativamente, puede usarse una disolución sólida de un agente biológicamente activo puede usarse en la preparación de goma de mascar, pastillas para chupar, o una forma de caramelo tal como una piruleta. Tales disoluciones sólidas pueden formarse a partir de masas fundidas conjuntas, coprecipitados, o por activación mecánica del portador de hidrato de carbono y el agente biológicamente

activo. El caramelo o goma se pone en la boca, donde los fluidos circundantes lo disuelven. En este entorno acuoso, puede comprobarse que el hidrato de carbono es el portador para facilitar la absorción de la glutamina en las células epiteliales de la cavidad oral, el esófago y el estómago.

5 Puede formarse también una pasta de dientes que incorpora un portador de hidrato de carbono y agente activo. Se ha descrito la microencapsulación de componentes en composiciones de pasta de dientes en la patente estadounidense n.º 4.348.378 (Kosti, 7 de septiembre de 1982), patente estadounidense n.º 4.071.614 (Grimm, 31 de enero de 1978) y patente estadounidense n.º 3.957.964 (Grimm, 18 de mayo de 1976), que describen la adición de aromatizantes encapsulados y componentes antiplaca a preparaciones de pasta de dientes convencionales.

10 La composición puede administrarse también a los tejidos epiteliales del colon y recto mediante un supositorio. Se conocen en la técnica métodos de preparación de formulaciones de supositorio. Se ha descrito un método de este tipo en la patente estadounidense n.º 4.439.194 (Harwood, *et al*, 27 de marzo de 1984), que describe un sistema de administración de agua y fármaco para uso en supositorio. Puede formarse también una preparación de enema de un portador de hidrato de carbono y un aminoácido, incorporando una cantidad de agua suficiente para formar una disolución acuosa. Puede administrarse también una disolución sólida del agente biológicamente activo en el portador de hidrato de carbono en un supositorio o enema, extrayendo el componente acuoso del colon o recto.

15 Cuando se prefiere la administración al estómago, puede usarse una cápsula rellena. Se ha descrito un método de este tipo en la patente estadounidense 5.569.466 (Tanner, *et al*, 29 de octubre de 1996), que describe la preparación de composiciones de relleno para cápsulas de gelatina blandas elásticas. Pueden emplearse comprimidos o cápsulas con recubrimiento entérico, o micropartículas con recubrimiento entérico para administrar las composiciones a los intestino superior o inferior.

20 Puede suministrarse la composición en formulaciones de helado, así como dulces congelados tales como el polo común. Formulaciones congeladas pueden ser especialmente eficaces para el tratamiento de úlceras orales y esofágicas, ya que pueden combinar, por ejemplo, tanto los efectos beneficiosos de la glutamina como los efectos calmantes de la mezcla fría.

25 Pueden administrarse también la glutamina y las composiciones de la invención por vía intravenosa o por vía intraperitoneal mediante infusión o inyección. Pueden prepararse disoluciones del compuesto activo o sus sales en agua, mezclados opcionalmente con un tensioactivo no tóxico. Pueden prepararse también dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

30 Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión pueden incluir disoluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el principio activo que están adaptadas para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables o infundibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma farmacéutica última debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado a vacío y liofilización, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional presente en las disoluciones esterilizadas por filtración anteriormente.

40 Para administración tópica, las composiciones de la invención pueden aplicarse en forma pura, es decir, cuando son líquidas. Sin embargo, será deseable generalmente administrarlas a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un portador dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido.

45 Los portadores sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los portadores líquidos útiles incluyen agua, alcoholes o glicoles o combinaciones de agua-alcohol/glicol, en las que los compuestos presentes pueden disolverse o dispersarse a niveles eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Pueden añadirse adyuvantes tales como fragancias y

agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse a partir de almohadillas absorbentes, usarse para impregnar vendajes y otros apósitos, o pulverizarse sobre la zona afectada usando pulverizadores de tipo bomba o aerosol.

5 Pueden emplearse también espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácido graso, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados con portadores líquidos para formar pastas, geles, ungüentos, jabones extensibles, y similares, para su aplicación directamente a la piel del usuario.

10 Se conocen en la técnica ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que pueden usarse para administrar la glutamina a la piel; por ejemplo, véase Jacquet *et al.* (patente estadounidense n.º 4.608.392), Geria (patente estadounidense n.º 4.992.478), Smith *et al.* (patente estadounidense n.º 4.559.157) y Wortzman (patente estadounidense n.º 4.820.508).

15 La glutamina y las composiciones de la invención pueden estar adaptadas también para administración tópica al ojo. Se emplea un vehículo oftalmológicamente aceptable tal como un vehículo acuoso, un gel o un ungüento. Pueden tamponarse tales vehículos hasta aproximadamente pH 5-6 y pueden contener también agentes conservantes, espesantes y solubilizantes, según se necesite. Preferiblemente, las composiciones se formulan como gotas oculares. Composiciones líquidas de gotas oculares a modo de ejemplo contienen hialuronato de sodio al 0,1% (peso molecular medio 1.800.000) o polisorbato 80 al 0,1% en peso con respecto a volumen en agua. Las composiciones líquidas pueden contener también tampones, sales isotónicas y conservantes tales como EDTA y timerisol.

20 Composiciones acuosas oftálmicas de la invención tienen un pH y una osmolalidad oftalmológicamente compatibles. Preferiblemente, estas composiciones incorporan medios para inhibir el crecimiento microbiano, por ejemplo a través de la preparación y el envasado en condiciones estériles y/o a través de la inclusión de una cantidad eficaz de manera antimicrobiana de un conservante oftalmológicamente aceptable.

25 En una forma preferida, la composición es composición acuosa gelificable *in situ*, más preferiblemente una disolución acuosa gelificable *in situ*. Una composición de este tipo comprende un agente gelificante en una concentración eficaz para promover la gelificación tras el contacto con el ojo con el fluido lacrimal en el exterior del ojo. Los agentes gelificantes adecuados incluyen, de manera no restrictiva, polímeros termoendurecibles tales como copolímeros de bloque de etilendiamina tetrasustituida de óxido de etileno y óxido de propileno (por ejemplo, poloxamina 1307); policarbofilo; y polisacáridos tales como goma gellan, carragenanos (por ejemplo, kappa-carragenanos y iota-carragenanos), quitosano y gomas de alginato.

30 El término "gelificable *in situ*" en el presente documento debe entenderse que abarca no sólo líquidos de baja viscosidad que forman geles tras el contacto con el ojo o con el fluido lacrimal en el exterior del ojo, sino también líquidos más viscosos tales como geles semifluidos y tixotrópicos que presentan rigidez del gel o viscosidad sustancialmente aumentada tras su administración en el ojo. De hecho, puede ser ventajoso formular una composición de la invención como un gel, para minimizar la pérdida de la composición inmediatamente después de la administración, como resultado por ejemplo del lagrimeo provocado por el reflejo de parpadeo. Aunque se prefiere que una composición de este tipo presente un aumento adicional de viscosidad o rigidez del gel tras la administración, esto no se requiere en absoluto si el gel inicial es suficientemente resistente a la disipación por el drenaje lacrimal como para proporcionar el tiempo de residencia eficaz especificado en el presente documento.

35 Las composiciones pueden administrarse también al ojo mediante un dispositivo de administración oftálmica. Por ejemplo; pueden aplicarse las composiciones a una lente de contacto antes de colocar la lente en el ojo, o después de que la lente de contacto esté en el ojo.

40 En cualquiera de estas preparaciones, la glutamina tiene una vida útil de almacenamiento estable y puede proporcionarse al paciente bastante antes del momento de administración. Las preparaciones pueden almacenarse en la clínica o el hogar del paciente para su administración según se necesite.

45 Pueden obtenerse sales farmacéuticamente aceptables usando procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, por ejemplo haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. Pueden prepararse también sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.

50 Tratamiento de sujetos mamíferos mediante potenciación de la absorción de aminoácidos.

Puede usarse la composición de la presente invención para tratar una variedad de trastornos fisiológicos de mamíferos, especialmente seres humanos. Es lo más eficaz para el tratamiento de trastornos que implican tejido epitelial, particularmente epitelio gastrointestinal (incluyendo orofaringe, esófago, estómago, intestinos y colon).

55 Se da a conocer una composición, una combinación de dosificación terapéuticamente eficaz de un aminoácido

seleccionado, o una combinación de aminoácidos, con una cantidad eficaz de portador(es) de hidrato de carbono que aumenta(n) la solubilidad acuosa y la absorción celular del aminoácido o aminoácidos para su administración al tejido epitelial del paciente.

5 Se da a conocer la administración de niveles terapéuticos de aminoácidos que presentan solubilidad acuosa limitada, tales como los aminoácidos de la dieta triptófano, tirosina, glutamina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, metionina, y fenilalanina. Pueden administrarse tanto D como L-aminoácidos, así como aminoácidos tales como citrulina, ácido g-aminobutírico, hidroxiprolina y ornitina, por ejemplo, para aumentar la absorción celular.

10 Pueden elegirse portadores de hidrato de carbono útiles para la composición de entre los azúcares, o bien monosacáridos o bien disacáridos, incluyendo, por ejemplo, D-alosa, D-altrosa, D-arabinosa, D-eritrosa, D-eritrosa, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, D-gliceraldehído, D-gulosa, D-lixosa, D-idosa, D-manosa, D-psicosa, D-ribosa, D-ribulosa, D-sorbosa, D-tagatosa, D-talosa, D-treosa, D-xilosa, D-xilulosa, maltosa, lactosa, y sacarosa. En algunos  
15 pacientes o estados fisiológicos, como por ejemplo, cuando es importante elegir un portador de hidrato de carbono que no promueva caries o provoque un aumento repentino en el nivel de glucosa en sangre, puede ser preferible elegir un poliol, o alcohol de azúcar, tal como, por ejemplo, sorbitol, eritritol, maltitol, manitol, o xilitol.

20 Para niños, particularmente, un alcohol de azúcar puede ser un portador preferible y puede producir un beneficio añadido más allá del efecto terapéutico deseado sobre el tejido diana. Por ejemplo, el xilitol reduce el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae* y se ha mostrado que tiene un efecto preventivo contra la otitis media aguda cuando se incorpora en una goma de mascar para niños (Uhari. M., *et al.*, Brit. Med. J. (1996) 313(7066): 1180-1184). Por tanto, el uso de xilitol como portador de hidrato de carbono para glutamina en una formulación de goma de mascar usada para tratar tejido epitelial oral o esofágico dañado tras quimioterapia o trasplante de médula ósea puede  
25 proporcionar también un beneficio protector contra un organismo patógeno.

Se da a conocer la identificación de trastornos fisiológicos para los que está indicada la complementación con aminoácidos. Más particularmente, se proporciona la administración de aminoácidos intracelulares aumentada a  
30 pacientes que presentan síntomas de un trastorno fisiológico para el que la complementación con aminoácidos puede ser de valor terapéutico. Numerosos trastornos fisiológicos o enfermedades se han vinculado, por ejemplo, con metabolismo defectuoso o absorción defectuosa de aminoácidos. En muchas situaciones, se desea administrar grandes concentraciones intracelulares de un aminoácido. En la mayoría de las situaciones, se prefiere también hacerlo así administrando una dosis limitada del aminoácido o aminoácidos seleccionados. Sin embargo, esto no ha sido posible anteriormente, puesto que muchos aminoácidos presentan absorción intracelular y solubilidad acuosa  
35 limitadas y deben administrarse por tanto en grandes dosis para lograr un efecto deseado. Se describen a continuación estados fisiológicos para los que se ha indicado la complementación con aminoácidos. Estos ejemplos se presentan como ejemplos de la amplia variedad de trastornos fisiológicos para los que puede ser útil la presente invención.

40 Potenciación de la absorción de aminoácidos para el tratamiento de niños y adultos con síndrome del intestino corto.

El síndrome del intestino corto está asociado con resección quirúrgica del intestino grueso, y da como resultado una disminución del área de superficie para la absorción. El tejido del intestino a menudo está irritado, con síntomas asociados tales como cólicos y diarrea. Se ha demostrado que una fórmula completa para lactantes a base de  
45 aminoácidos es eficaz en la mejora de la tolerancia al alimento, eliminando la necesidad de nutrición parenteral y mejorando la función intestinal en niños con síndrome del intestino corto grave (Bines, J., *et al.*, J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. (1998) 26(2): 123-128). Puede lograrse el aumento de la absorción de aminoácidos, particularmente aquellos aminoácidos que presentan captación celular y solubilidad acuosa limitadas (por ejemplo, triptófano, tirosina, glutamina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, metionina, y fenilalanina), tanto en niños como en adultos con síndrome del intestino corto. Cuando se usa para el tratamiento  
50 de pacientes con síndrome del intestino corto, la combinación de concentraciones terapéuticamente eficaces de aminoácidos y una cantidad eficaz de portador de hidrato de carbono proporciona niveles aumentados de captación celular de aminoácidos en el epitelio intestinal, proporcionando de ese modo un mayor beneficio al paciente y reduciendo las cantidades de aminoácidos que deben administrarse con el fin de lograr niveles terapéuticos  
55 satisfactorios.

Puede administrarse la combinación de aminoácidos y portador de hidratos de carbono mediante una variedad de vías farmacéuticamente aceptables, incluyendo comprimidos, comprimidos oblongos o cápsulas recubiertas para su  
60 administración a los intestinos o el colon, así como suspensiones o disoluciones de enema. Pueden determinarse dosificaciones terapéuticas por el médico del paciente, teniendo en consideración la edad, el tamaño y el estado nutricional del paciente.

Potenciación de la absorción de aminoácidos en pacientes de diálisis

65 Los pacientes de diálisis presentan comúnmente malnutrición. Sin embargo, se ha mostrado que la complementación con una mezcla de 8 aminoácidos esenciales y 9 no esenciales mejora tanto la salud como el

estado de ánimo de pacientes de diálisis. (Mastroiacovo, P., *et al*, Clin. Ther. (1993) 15(4): 698-704). Puede combinarse una combinación de aminoácidos, en cantidades terapéuticamente eficaces, con una cantidad eficaz de un portador de hidrato de carbono para potenciar la solubilidad y captación celular de los aminoácidos, aumentando de ese modo el efecto terapéutico de la complementación con aminoácidos y disminuyendo la dosificación de aminoácido requerida para lograr el efecto terapéutico.

Un modo de administración preferido para pacientes de diálisis puede ser un comprimido, un comprimido oblongo, una cápsula con recubrimiento entérico o una perla recubierta que contiene una cantidad eficaz de cada uno de una variedad de aminoácidos en combinación con una cantidad eficaz de un portador de hidrato de carbono, tal como sacarosa o un poliol tal como xilitol o sorbitol. Para la administración a pacientes diabéticos, el portador de hidrato de carbono preferido es un poliol.

#### Absorción potenciada de glutamina para el tratamiento de heridas

La glutamina es un precursor para la síntesis de nucleótidos. Es tanto un activador de la síntesis de proteínas como un inhibidor de la degradación de proteínas. Es un activador de la síntesis de glucógeno, así como un sustrato metabólico para células que se dividen rápidamente. También es una fuente de energía para células epiteliales. El tratamiento de heridas, ya sean superficiales o no superficiales, con la composición descrita para potenciar la absorción de aminoácidos, aumenta la absorción de glutamina en tejidos epiteliales, promoviendo una cicatrización de heridas más rápida. Además de promover la cicatrización de heridas aumentando la absorción de glutamina, puede protegerse la herida de la infección con organismos patógenos. El llenado de heridas infectadas con azúcar ha sido una práctica durante siglos. Se sabe desde hace mucho tiempo que la miel tiene propiedades antibacterianas debido, en parte, a la concentración de azúcar hipertónica. (Basson, N. *et al*, J. Dent. Assoc. S. Afr. (1994) 49(7): 339-341; Jeddar, A., *et al*, S. Afr. Med. J. (1985) 67(7): 257-258; Willix, D., *et al*, J. Appl. Bacteriol. (1992) 73(5): 388-394).

Una combinación de azúcar y povidona-yodo ha sido eficaz en la promoción de una rápida cicatrización, reduciendo la contaminación bacteriana, y el relleno de defectos con tejido de granulación cuando se usa para tratar pacientes con heridas, quemaduras o úlceras. (Knutson, R., *et al*, South Med. J. (1981) 74(11): 1329-1335). Sin embargo, aunque se añade a las propiedades antibacterianas del entorno de azúcar hipertónico, la povidina-yodo destruye los glóbulos blancos.

La combinación de glutamina con un portador de hidrato de carbono, por tanto, proporciona un beneficio doble para el cuidado de heridas: el aumento de la glutamina absorbida por las células epiteliales proporciona una fuente de energía para las células epiteliales, promoviendo la división celular y la cicatrización, mientras que también proporciona una fuente de energía para los glóbulos blancos necesarios para proteger los tejidos subyacentes de la invasión bacteriana, y el portador de hidrato de carbono protege la superficie de la herida de la contaminación bacteriana proporcionando un entorno en que la alta presión osmótica y la baja disponibilidad de agua impiden el crecimiento microbiano.

Para el cuidado de heridas, la combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de glutamina y un portador de hidrato de carbono, preferiblemente sacarosa o miel, se aplica por vía tópica como una formulación semisólida de una alta concentración de azúcar mezclada con agua y glutamina. Alternativamente, la combinación se proporciona como un jarabe espeso para aplicación tópica a la zona afectada. Otra aplicación es proporcionar la formulación como un sólido que va a aplicarse a la zona de la herida, extrayendo su fracción acuosa del entorno de la herida. Una preparación de este tipo, si se proporciona en forma de polvo o cristalina, puede colocarse fácilmente en un kit de primeros auxilios u otro kit de atención de emergencia para el tratamiento de heridas.

La combinación puede ser especialmente eficaz para el tratamiento de quemaduras, en las que los objetivos principales del tratamiento son la protección del tejido de la infección y la regeneración rápida de nuevo tejido.

#### Potenciación de la absorción de glutamina para el tratamiento de mucositis y estomatitis

La mucositis es una reacción inflamatoria, caracterizada por lesiones similares a quemaduras o lesiones ulcerativas del tejido epitelial del tubo digestivo desde la boca hasta el ano. Puede resultar de la exposición a o bien radiación ionizante o bien agentes quimioterápicos. La estomatitis es cualquier reacción inflamatoria que afecta a la mucosa oral, con o sin úlceras acompañantes. La mucositis, en particular, se complica a menudo adicionalmente por la infección del tejido ulceroso.

Estudios han mostrado anteriormente que la aplicación oral de disoluciones de glutamina puede mejorar los síntomas que acompañan a la mucositis en algunos pacientes con trasplante de médula ósea y pacientes de quimioterapia. (Skubitz, K., y P. Anderson, J. Lab. Clin. Med. (1996) 127(2): 223-228; Anderson, P., *et al*, Bone Marrow Transplant (1998) 22(4): 339-344; Anderson, P., *et al*, Cancer (1998) 83(7): 1433-1439; patente estadounidense n.º 5.545.668 (Skubitz, *et al*, 13 de agosto de 1996); y patente estadounidense n.º 5.438.075 (Skubitz, *et al*, 1 de agosto de 1995). Usando la composición descrita en el presente documento, pueden administrarse concentraciones de glutamina intracelulares aumentadas y eficaces a tejidos epiteliales del sistema

gastrointestinal para el tratamiento de mucositis o estomatitis sin aumentar la dosificación de glutamina absoluta.

La composición puede proporcionarse, por ejemplo, como un colutorio, preparación de enjuagar y tragar, pastilla para chupar o caramelo duro para el tratamiento de úlceras orales. Para úlceras esofágicas, puede usarse una bebida, incluyendo una bebida azucarada, un batido o una suspensión congelada. También pueden usarse insertos biodegradables para tratar la boca y la garganta. Pueden tratarse niños, así como adultos, con mucositis o estomatitis usando cualquiera de estas preparaciones, aunque puede preferirse una preparación de hidrato de carbono, glutamina y aromatizantes administrada como un polo o en combinación con un sorbete, un helado de agua o un helado. Estos proporcionan el beneficio añadido de un frío calmante sobre el tejido ulceroso. También puede usarse una preparación de goma de mascar, preferiblemente una goma de mascar con un centro líquido o semisólido, para el tratamiento de úlceras orales y esofágicas.

Para la terapia de úlceras gástricas, pueden administrarse comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas o perlas recubiertas que contienen la composición de hidrato de carbono/glutamina. Para úlceras intestinales, pueden administrarse comprimidos recubiertos, comprimidos oblongos, cápsulas o perlas recubiertas para administración o bien entérica o bien colónica. Se conocen en la técnica recubrimientos entéricos o recubrimientos para administración colónica y se han descrito anteriormente en el presente documento.

Potenciación de la absorción de glutamina para el tratamiento de criptosporidiosis

*Cryptosporidium parvum* es una causa principal de diarrea persistente en países en desarrollo. Debido a su resistencia al cloro, se ha convertido también en una amenaza en algunos suministros de agua en los Estados Unidos. La criptosporidiosis es particularmente problemática en pacientes con sida, los ancianos y los recién nacidos, en los que provoca una diarrea grave, potencialmente mortal. *Cryptosporidium parvum* infecta el tejido intestinal, pero no infecta más allá de la superficie más superficial del epitelio intestinal. En un modelo de lechón, aproximadamente dos tercios de la superficie de las vellosidades intestinales estaban dañados durante la infección por criptosporidios. En el tejido epitelial restante, el aumento del metabolismo de la glutamina está asociado con un intercambio de sodio-hidrógeno acoplado a un mecanismo de transporte de cloruro. Debido a su asociación directa con el mecanismo de transporte de cloruro, la glutamina puede ser particularmente terapéutica para la reparación de tejido dañado por la infección por *Cryptosporidium*. (Guerrant, R., Emerging Infectious Diseases (1997) 3(1): 51-57). El tejido infectado ha perdido gran parte del área de superficie de absorción, sin embargo, tratando al paciente con la composición de portador de hidrato de carbono y una dosis terapéutica de glutamina, se potencia la captación de glutamina en las células restantes compensando la disminución del área de superficie de absorción.

La composición puede administrarse usando un comprimido oblongo, un comprimido o una cápsula recubierta para administración intestinal. Alternativamente, la composición puede infundirse o administrarse como una disolución de enema para recubrir el revestimiento del intestino con el portador de hidrato de carbono/glutamina y potenciar la absorción de glutamina en las células epiteliales intestinales restantes.

Esto también puede ser útil como factor en la prevención de enfermedades, puesto que se sabe que la glutamina proporciona una fuente de energía primaria para glóbulos blancos, que migran entre las células del revestimiento del intestino y son responsables de la destrucción de organismos patógenos tales como *C. parvum*. La potenciación de la absorción de glutamina en las células epiteliales y los glóbulos blancos proporciona por tanto un método para mejorar la respuesta inmunitaria mientras que se mantiene la integridad estructural del revestimiento epitelial del intestino. Para pacientes en riesgo de infección por *Cryptosporidium*, pueden administrarse cápsulas con recubrimiento entérico para mantener la integridad de células epiteliales y mejorar la respuesta inmunitaria.

Potenciación de la absorción de glutamina para mejorar la cicatrización de heridas posquirúrgicas en el tubo digestivo

Tras la resección quirúrgica dentro de la cavidad oral, el intestino o las tripas, puede tratarse el daño en el tejido epitelial para aumentar la integridad del tejido y promover la cicatrización de heridas. Tras la cirugía oral, puede proporcionarse al paciente una preparación de enjuagar y tragar, un colutorio, una pastilla para chupar, un caramelo o una preparación de goma de mascar que contiene la composición de la presente invención para permitir una fácil administración de una dosis terapéuticamente eficaz de glutamina en combinación con un portador de hidrato de carbono. Particularmente en pacientes que se han sometido a cirugía oral, se prefieren portadores de hidrato de carbono no cariogénicos. Tales portadores de azúcar incluyen, por ejemplo, maltitol, lactitol, sorbitol, y xilitol. El portador de hidrato de carbono de poliál más preferible para su incorporación en la composición es xilitol.

Tras cirugía intestinal, la composición puede administrarse en forma de un comprimido recubierto, un comprimido oblongo, una cápsula, o una perla recubierta. El comprimido, el comprimido oblongo, la cápsula, o la perla recubierta pueden recubrirse con un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, acetato-ftalato de celulosa, acetato-trimelitato de celulosa, acetato-succinato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, y carboximetilcelulosa, para administración entérica. Puede recubrirse un comprimido, un comprimido oblongo o una cápsula con una resina de base acrílica para que se disuelva a pH superior (pH 7) para proporcionar administración al colon e íleo distales. Alternativamente, la administración de la composición de

glutamina/portador de hidrato de carbono puede proporcionarse en forma de un supositorio, usando una base tal como manteca de cacao u otro glicérido, o como un comprimido rectal sin una base de supositorio convencional. Tales composiciones para uso de supositorios se han descrito por Mizuno, *et al*, en la patente estadounidense n.º 4.462.984, y Harwood, *et al*, en la patente estadounidense n.º 4.439.194.

Para tratamiento de pacientes diabéticos, el xilitol es el portador de hidrato de carbono preferido, ya que el sorbitol no se absorbe en el intestino y podría provocar molestias intestinales añadidas.

Potenciación de la absorción de glutamina para el tratamiento de lactantes con bajo peso al nacer

Neu, *et al.*, han notificado que neonatos con muy bajo peso al nacer que reciben complementación con glutamina enteral tienen una tasa de supervivencia aumentada. (J. Pediatrics, (1997) 131(5): 691-699). Pueden lograrse dosificaciones de glutamina intracelulares terapéuticas aumentadas con una administración de glutamina real disminuida. En neonatos con bajo peso al nacer, particularmente, el logro del efecto deseado con dosis más pequeñas de nutriente puede ser esencial.

Para la administración de la composición, se prefiere un tubo de alimentación enteral. Puede elegirse uno cualquiera de varios portadores de hidrato de carbono, aunque se prefieren sacarosa y jarabe de maíz con alto contenido en fructosa. La dosificación terapéutica de glutamina puede determinarse por el médico individual, usando medios convencionales de cálculo de la dosificación, teniendo en cuenta que la absorción de glutamina se potencia mediante la combinación con el portador de hidrato de carbono hasta niveles de al menos diez veces superiores que los logrados mediante la administración de glutamina sola. Pueden añadirse excipientes a la fórmula de alimentación, incluyendo aromatizantes y estabilizadores. También pueden incluirse nutrientes añadidos, incluyendo vitaminas, aminoácidos y nutrientes recomendados tales como lactoferrina.

Potenciación de la absorción de glutamina para tratar lesiones dermatológicas de origen bacteriano y viral

Varias enfermedades virales pueden reconocerse por lesiones epiteliales. Entre éstas están, por ejemplo, lesiones herpéticas alrededor de la boca, las lesiones asociadas con impétigo y las lesiones dolorosas conocidas como herpes, características del virus de la varicela zoster. Tales lesiones pueden tratarse por vía tópica aplicando la composición de glutamina/portador de hidrato de carbono a la zona afectada. El componente de glutamina de la composición ayuda en la cicatrización proporcionando energía a las células epiteliales, mientras que el azúcar proporciona propiedades antibacterianas para proteger el tejido dañado o infectado de la infección adicional.

Para aplicación tópica, se prefiere una loción o crema, que incorpora glutamina, un portador de hidrato de carbono y excipientes tales como agentes estabilizadores, agentes gelificantes, o agentes espesantes.

Potenciación de la absorción de glutamina para tratar pacientes infectados con virus de la inmunodeficiencia humana

El tejido linfoide gastrointestinal alberga más del 90% de los linfocitos totales en el cuerpo. Estudios han mostrado que el epitelio gastrointestinal contiene una gran población de progenitores de CD4 CD34<sup>+</sup>. (Mattapallil, J., *et al*, J. Virol. (1999) 73(5): 4518-4523). Se ha demostrado que el tubo digestivo es un sitio principal de agotamiento de células T CD4<sup>+</sup> y replicación viral en la infección por el virus de la inmunodeficiencia de simios. Otros estudios han mostrado que la glutamina potencia la producción de citocinas derivadas de linfocitos T. (Yaqoob, P. y P. Calder, Cytokine (1998) 10(10): 790-794). La potenciación de la absorción de glutamina en la mucosa intestinal puede proporcionar un beneficio terapéutico a pacientes infectados por VIH, particularmente aquellos pacientes que están en los estadios tempranos de la infección. La potenciación de la respuesta de citocinas a la infección viral puede contribuir a la destrucción viral por el sistema inmunitario en el sitio de replicación viral significativa.

La composición de glutamina/portador de hidrato de carbono puede administrarse en forma de un comprimido con recubrimiento entérico, un comprimido oblongo, una cápsula, o una perla recubierta. Los portadores de azúcar adecuados incluyen preferiblemente, por ejemplo, sacarosa, glucosa, jarabe de maíz con alto contenido en fructosa y xilitol.

Se prefiere la administración diaria de niveles de glutamina recomendados en la dieta, puesto que la administración de esta cantidad de glutamina mediante el método de la presente invención puede dar como resultado un aumento de la administración de glutamina al epitelio intestinal en un factor de, por ejemplo, 10-30x. Por tanto, la administración de cantidades más moderadas puede producir una concentración intracelular de glutamina incluso mayor que la que se ha logrado anteriormente mediante la administración de dosificaciones superiores de glutamina sola.

Potenciación de la absorción de glutamina para terapia contra el cáncer

La complementación con glutamina aumenta la selectividad de tanto la radioterapia como la quimioterapia por células tumorales. La complementación con glutamina disminuye el crecimiento tumoral, y en combinación con

quimioterapia o radioterapia, potencia la disminución del volumen tumoral. También se muestra en el presente documento que la complementación con glutamina potencia la actividad de células citotóxicas naturales.

5 La complementación con glutamina potencia la tolerancia a agentes quimioterápicos y a radioterapia. Se cree que esto se logra dotando a células normales de una fuente de energía y un medio para lograr la reparación celular.

10 La composición proporciona un aumento de la absorción de glutamina en células epiteliales gastrointestinales. Una vez absorbida en estas células, está disponible más glutamina para que circule a otros tejidos del cuerpo. La potenciación de la absorción de glutamina también proporciona un medio para aumentar la producción de glutatión en el intestino. Por tanto, la terapia contra el cáncer puede consistir en, o potenciarse mediante, la administración diaria de glutamina en mezcla con una cantidad de portador de hidrato de carbono, tal como, por ejemplo, sacarosa, glucosa, xilosa, xilitol, jarabe de maíz con alto contenido en fructosa o sólidos de jarabe de maíz eficaces para aumentar la absorción de glutamina en el epitelio gastrointestinal. La composición puede usarse para terapia contra el cáncer tanto en seres humanos como veterinaria.

15 Se determinarán las dosis diarias de glutamina por el médico del paciente individual, teniendo en consideración factores que conocen los expertos en la técnica para efectuar el cálculo de la dosificación, tales como, por ejemplo, el tamaño corporal y la edad. Las dosis diarias recomendadas de glutamina para terapia contra el cáncer son preferiblemente al menos de una ingesta máxima en la dieta de 3-4 gramos al día, aunque pueden administrarse dosis inferiores, puesto que la composición y el método de la presente invención aumentan la absorción de glutamina en al menos un factor de diez, y más preferiblemente, 100.

Otros usos para el aumento de la absorción de aminoácidos

25 Aunque el tratamiento de trastornos fisiológicos en pacientes se ha descrito principalmente en cuanto a administración de glutamina, la descripción no pretende limitarse a la administración de niveles potenciados de glutamina sola. Por ejemplo, se ha demostrado que la D-serina es terapéutica para el tratamiento de esquizofrenia cuando se administra conjuntamente con medicamentos antipsicóticos. (Tsai, G., *et al*, *Biol. Psychiatry* (1998) 44(11): 1081-1089). Por tanto, la absorción potenciada de D-serina en los epitelios intestinales tras la administración oral puede proporcionar un método para aumentar la D-serina disponible para la circulación sistémica. Se propone que la enfermedad de Canavan, un trastorno genético autosómico, se beneficia de la complementación con ácido aspártico en la dieta. (Baslow, M. Y T. Resnik, J. *Mol. Neurosci.* (1997) 9(2): 109-125). Por tanto, la detección temprana de la enfermedad puede acompañarse por complementación con ácido aspártico mediante el método de la presente invención para potenciar la captación de ácido aspártico, un aminoácido con una solubilidad acuosa de sólo 0,778 g/100 g a 25°C, para proteger contra la degeneración progresiva del cerebro que es característica de la enfermedad.

40 Estos son sólo dos ejemplos de varios estados fisiológicos que pueden tratarse terapéuticamente usando absorción de aminoácidos potenciada. Puesto que se identifica que los aminoácidos tienen valor terapéutico, puede potenciarse adicionalmente la complementación en la dieta proporcionando el complemento de aminoácido en combinación con un portador de hidrato de carbono tal como se describe mediante la invención.

Uso veterinario para la absorción de aminoácidos potenciada en células epiteliales

45 Los cerdos destetados de manera temprana desarrollan atrofia intestinal, y se ha propuesto la complementación con glutamina para prevenir el daño en el epitelio intestinal y proporcionar un beneficio en la producción porcina. (Wu, *et al.*, *J. Nutr.* (1996) 126 (10): 2578-84). La composición puede usarse para potenciar la absorción de aminoácidos en las células del tejido epitelial, disminuyendo de ese modo los costes asociados con la complementación con aminoácidos. La composición también es útil para el tratamiento veterinario de perros y otros mamíferos en los que se ha iniciado quimioterapia. Por ejemplo, la doxorubicina, asociada con úlceras gastrointestinales en pacientes con quimioterapia humanos, es el tratamiento recomendado para varios otros cánceres de mamíferos, incluyendo hemangiosarcoma canino. La composición proporciona absorción de aminoácidos potenciada en el epitelio dañado del sujeto mamífero, así como un aumento de los aminoácidos sistémicamente disponibles aumentado la absorción en el epitelio gastrointestinal.

55 La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 1.

60 Evaluación de la captación celular de glutamina en combinación con sacarosa y sorbitol

Se ha mostrado que la composición de la presente invención mejora la solubilidad y absorción celular de un aminoácido, glutamina, en células epiteliales gastrointestinales humanas, tal como se ilustra en el siguiente ejemplo.

## 1. Materiales y métodos

Se añadió agua destilada, desionizada (107 ml) a 207 gramos de una mezcla de sacarosa, sorbitol y glutamina con excipientes (Aesgen-14) tal como se enumera en la tabla 1.

5

Tabla 1. Aesgen-14 (AES-14)

L-Glutamina	240,0 kg	57,95% en peso*	50,00% p/v**
Sacarosa	144,0 kg	34,77% en peso	30,00% p/v
Sorbitol cristalino	13,44 kg	3,24% en peso	2,80% p/v
Glicerina	14,0 kg	2,92% en peso	2,52% p/v
Fosfato de sodio monobásico (anhidro)	2,6 kg	0,63% en peso	0,54% p/v
Gel de celulosa Avicel tipo CL-611	874,0 g	0,18% en peso	0,17% p/v
Ácido cítrico (anhidro)	280,0 g	0,07% en peso	0,06% p/v
Goma xantana	230,0 g	0,05% en peso	0,04% p/v
Carragenanos	230,0 g	0,05% en peso	0,04% p/v
Aroma artificial	230,0 g	0,05% en peso	0,04% p/v
Metilparabeno	207,0 g	0,04% en peso	0,04% p/v
Polvo de sorbato de potasio	180,0 g	0,04% en peso	0,04% p/v
Emulsión de simeticona al 30%	115,0 g	0,02% en peso	0,02% p/v

\* Los porcentajes en peso se expresan como el porcentaje del peso total de componentes secos para su reconstitución con agua en un frasco de 240 ml.

10

\*\* Los porcentajes de peso/volumen se expresan como el porcentaje del peso total en mezcla acuosa.

15

Como control, se añadieron 200 mililitros de agua destilada, desionizada a 50 gramos de L-glutamina (Ajinomoto, Raleigh NC) y se mezclaron mediante agitación. Se dejaron reposar ambos frascos durante 1 día a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante del residuo y se usó para la determinación de la captación celular.

20

En el día 1, se sembraron en placa células de una línea de células epiteliales gastrointestinales (CaCo) a una densidad de  $0,5 \times 10^6$  células por pocillo en una placa de cultivo de tejido de 6 pocillos. En el día 2, se reemplazó el medio de cultivo por o bien medio de crecimiento normal o bien medio deficiente en L-glutamina.

25

En el día 3, se evaluaron las células cultivadas tanto en medio de crecimiento normal ("normal") como medio de crecimiento deficiente en L-glutamina ("privado") para la comparación de la captación de glutamina usando la disolución Aesgen-14 en paralelo con la disolución de L-glutamina, según el siguiente protocolo: Se añadieron dos mililitros de material de prueba (o bien disolución Aesgen-14 o bien disolución de L-glutamina) a los pocillos apropiados, entonces se incubaron a 37°C. A los puntos de tiempo de 0, 10, 20, 40 y 60 segundos, se aspiró el material de prueba y se lavaron las células tres veces (3x) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada (4 °C), seguido por la adición de 1,0 ml de ácido perclórico. Se recogieron las células mediante raspado, luego aspiración mediante pipeta a un tubo de 1,7 ml.

30

Se sonicaron las células recogidas durante 10 segundos, y se transfirieron 500 µl de células sonicadas a un tubo de 1,7 ml. Se neutralizó el ácido perclórico mediante la adición de 130 µl de KHCO<sub>3</sub> 2 M, y se congeló la mezcla resultante durante la noche a -80°C.

35

Tras descongelar, se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 14.000 rpm y se transfirieron los sobrenadantes a tubos de 1,7 ml nuevos y se congelaron a -80°C. Se descongelaron las muestras clarificadas resultantes y se diluyeron 1:3 con agua desionizada. Se retiraron cincuenta microlitros, se añadieron a 10 microlitros de o-ftaldialdehído completo (Sigma P-0532) y se mezclaron mediante agitación. Tras la incubación durante dos minutos a temperatura ambiente, se inyectó una muestra de 20 µl en una columna de HPLC Hypersil® C18 Elite de 5 µm usando acetonitrilo:agua 70:30 como fase móvil. Se detectaron los niveles de glutamina, medidos como µg/ml, a 340 nm.

40

## 2. Resultados

Se muestran los resultados en la tabla 2 como captación media celular de glutamina en µg/ml:

45

Tabla 2

Tiempo de incubación (segundos)	0	10	20	40	60
Células normales + Aesgen 14	1,00	1568,55	900,60	1185,88	1765,13
Células normales + L-glutamina	3,53	10,30	2,48	3,23	4,85
Células sometidas a privación + Aesgen 14	0,00	613,10	672,93	1213,40	1053,85
Células sometidas a privación + L-glutamina	1,33	1,43	1,49	2,23	49,96

5 Tal como se resumió anteriormente, aumenta significativamente la captación de glutamina tanto en células normales (363x) como en células sometidas a privación (21x) en células tratadas con Aesgen-14 en comparación con células tratadas con L-glutamina acuosa sola.

### Ejemplo 2

10 AES-14 oral restaura la producción de glutatión por el intestino alterada por DMBA.

15 Introducción: El mecanismo mediante el cual la glutamina (GLN) oral previene el cáncer de mama inducido por DMBA es desconocido. Mientras que la GLN triplica la extracción negativa de glutatión (GSH) del intestino en ratas, 7,12-dimetilbenz[*a*]antraceno (DMBA) la altera significativamente. Se no se ha notificado el flujo real de GSH en el intestino. Se plantea la hipótesis de que el intestino es un productor de GSH, DMBA bloquea la producción de GSH por el intestino y GLN como complemento oral antagoniza este efecto.

20 Métodos: Se aleatorizaron 80 ratas Sprague-Dawley a 4 grupos (n=20/grupo): DMBA+GLN, DMBA+FA, ACEITE+GLN, ACEITE+FA. Se alimentaron por sonda las ratas (edad de 50 días) con una dosis de una sola vez de 20 mg DMBA o aceite. Se alimentaron por sonda las ratas con AES-14 (1 g de GLN/kg/día) o una cantidad isonitrogenada de Freamine (FA) desde 1 semana antes hasta el sacrificio a 1 semanas tras DMBA (el mayor efecto sobre la extracción de GSH del intestino). Se extrajeron sangre arterial y portal para la determinación de los niveles de GLN y GSH, y se midió el flujo de sangre usando 14-C-PAH. Se calcularon los flujos de GLN y GSH en el intestino (captación o producción).

25 Resultados: DMBA suprimió la producción de GSH normal (flujo negativo) en ACEITE+FA mientras que no afectó al metabolismo de GLN (figura 3). GLN mantuvo la producción de GSH en DMBA+GLN (figura 3).

30 Conclusiones: La administración oral de AES-14 restaura la producción de GSH normal en animales tratados con DMBA, lo que sugiere uno de los mecanismos mediante los cuales GLN previene el cáncer de mama en este modelo. La captación sin cambios de GLN en los animales tratados con DMBA puede indicar un bloqueo en el transporte de GSH en vez de producción intracelular real.

### Ejemplo 3

35 Efecto de la complementación con glutamina (AES-14) sobre los niveles de IGF-1 séricos.

40 Los niveles de factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1) se correlacionan con tasas superiores de proliferación celular en la mama *in vitro* e *in vivo* (Ma, J. *et al.*, JNCI 91:620, 1999; Hinkinson, S.E., *et al*, Lancet 351:1393, 1998). Se plantea la hipótesis de que la inhibición del crecimiento tumoral observada con glutamina oral puede ser secundaria a la disminución de los niveles séricos de IGF-1. Esto se basa en el conocimiento de que un mecanismo de eliminación de IGF-1 es a través de GSH que se compleja con IGF-1 GSH. El aumento de los niveles de GSH en el hígado aceleraría esta eliminación.

45 Métodos:

50 Se aleatorizaron ciento noventa y dos ratas Sprague-Dawley hembra de 50 días de edad a sonda nasogástrica con 1 g/kg/día de Gln en una disolución acuosa al 3%, Freamine isonitrogenada (una mezcla de aminoácidos esenciales y no esenciales, FA), o agua, alimentación apareada con una dieta definida de alimento TD96163, y se alimentaron por sonda con DMBA 100 mg/kg en aceite de sésamo frente a sonda nasogástrica de aceite control a tiempo 0. Se usó la dosis de 100 mg/kg de DMBA y los mismos momentos en los restantes experimentos para promover una tumorigénesis del 100% en los grupos control. Se sacrificaron ratas de cada grupo (n=48) a las semanas 1, 2, 4 y 11. Se midieron los niveles de Gln arteriales, IGF-1 séricos y el crecimiento tumoral a lo largo del tiempo. Se midieron los niveles de IGF-1 séricos usando el kit de radioinmunoensayo de rata DSL-2900 (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas) siguiendo las instrucciones del fabricante.

55

## Resultados:

Gln oral, como AES-14, elevó significativamente los niveles de Gln y GSH arteriales (~10%, datos no mostrados) mientras que disminuyó los niveles séricos de IGF-1 (~10-30%) (figuras 4 y 5). Se sostuvieron los niveles de IGF-1 inferiores a lo largo del tiempo en presencia o ausencia de DMBA. Gln de complementación oral redujo significativamente de nuevo la carcinogénesis de DMBA (100 mg/kg) en este modelo de rata en un 50% frente a DMBA+FA y DMBA+H<sub>2</sub>O, p<0,05. Esto se compara con una reducción del 80 al 90% usando DMBA 80 mg/kg. La reducción en los niveles de IGF-1 y la disminución en el crecimiento tumoral en los grupos de Gln son similares a las observadas con tamoxifeno en este modelo (Jordan, VC, Reviews on Endoc Rel. Cancer (supl. de octubre) 49-55, 1978).

Ejemplo 4

La complementación con glutamina inhibe el desarrollo tumoral en cáncer de mama inducido por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno a través de la potenciación de la apoptosis.

## Introducción:

A pesar del hecho de que GLN estimula el crecimiento de células tumorales *in vitro*, la complementación con GLN reduce significativamente el crecimiento tumoral *in vivo* y potencia la destrucción del tumor tanto con radiación como con quimioterapia (Klimberg *et al*, JPEN, 16: 1606-09 (1992), Farr *et al.*, JPEN, 18: 471-76 (1994), Rouse *et al*, Ann. Surg., 221: 420-26 (1995)). Se ha postulado que el efecto inhibidor de GLN sobre el crecimiento tumoral se produce mediante estimulación de la producción de glutatión (GSH) (Feng *et al.*, Surg. Forum, XL VII: 524-526 (1996)). GSH es el antioxidante natural más abundante y desempeña un papel central en la defensa del organismo frente a infección, radicales libres y carcinógenos (Larsson *et al.*, en: The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease (Eds. Scriver CF, Beaud *et al*, Sly WS & Vallee D), McGraw Hill, Nueva York 8ª edición p. 2205-2216 (2001)). Sin embargo, estudios recientes han establecido que los niveles de GSH son elevados en tejidos de cáncer de mama, colon, ovario y pulmón en comparación con tejido normal. Los niveles de GSH tumorales elevados estaban asociados con un aumento de la resistencia a la quimioterapia (Schnelldorfer *et al.*, Cancer, 89: 1440-1447 (2000)). Por tanto, un agotamiento selectivo del GSH tumoral podría inhibir el crecimiento tumoral y presenta una nueva estrategia prometedora en la prevención del cáncer.

Se acepta ahora generalmente que la inhibición de la apoptosis desempeña un papel en el proceso carcinogénico. Estudios funcionales han determinado que la expresión elevada de miembros de la familia Bcl-2 antiapoptóticos (Bcl-2, BC1-X<sub>L</sub>, Mcl-1, A1) o la expresión disminuida de miembros de la familia Bcl-2 proapoptóticos (Bad, Bax, Bid, Bik, Bak, Bcl-Xs) puede inhibir la ruta mitocondrial (Kaufmann *et al.*, BioEssays, 22:1007-1017 (2000) y Reed, J. Cell Biol., 124: 1-6 (1994)). Se ha sugerido una correlación positiva entre los niveles de GSH y Bcl-2 (Voehringer, Free Radic. Biol. Med., 27: 945-950 (1999) y Hall, Eur J de Clin. Investig., 29:238-245 (1999)). Se ha establecido, por ejemplo, que la sobreexpresión de Bcl-2 en la membrana externa de la mitocondria inhibía la formación de especies reactivas de oxígeno en células expuestas a varios desencadenantes apoptóticos (Hockenbery *et al*, Cell, 75: 241-251 (1993)). DMBA es un hidrocarburo aromático policíclico, metabolizado en el organismo a través de una oxidación para producir un diol-epóxido, que forma aductos de ADN (Dipple *et al.*, Chem.-Biol. Interactions, 20: 17-26 (1978) y Wei, Med. Hypth., 39:267 (1992)). Una única dosis de DMBA a ratas puberales induce carcinomas mamarios de origen ductal en el 100% de los animales aproximadamente 11 semanas después de la aplicación de DMBA (Huggins *et al.*, Nature, 189: 204-207 (1961)). Se ha mostrado anteriormente que el cáncer de mama inducido por DMBA en ratas estaba asociado con una inhibición significativa de la producción de GSH, lo que provoca el agotamiento de GSH (Cao *et al.*, J. Surg. Res., 100:135-140 (2001)). Sin embargo, la complementación con GLN disminuyó significativamente el crecimiento tumoral y restauró los niveles de GSH disminuidos en sangre, tejido de mama y mucosa del intestino (Klimberg *et al.*, Am. J. Surg., 172:418-424 (1996)). Basándose en los resultados, se planteó la hipótesis de que GLN estimula la apoptosis en las células cancerosas a través de su agotamiento de GSH. Por tanto, en este caso, se estudió el efecto de GLN sobre los niveles de GSH y la actividad enzimática de caspasa-3 en células tumorales, así como la expresión génica de caspasa-3, Bcl-2, Bax y p21 en tumores usando RT-PCR relativa.

## Materiales y métodos:

*Animales experimentales y tratamiento.* Se usaron ratas Sprague-Dawley hembra puberales fechadas con hora (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, EN) de menos de 50 días de edad y que pesaban aproximadamente 150 g. se aprobaron todos los estudios por el Animal Care and Use Committee en el Central Arkansas Veterans Healthcare System. Se mantuvieron las ratas en jaulas convencionales en la instalación de cuidado de animales y se sometieron a un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Durante el periodo de estudio, las ratas recibieron una alimentación apareada con una dieta predefinida de alimento (TD 96163) y se les administró agua a voluntad. A la edad de 50 días, se aleatorizaron las ratas a 2 grupos experimentales y recibieron una única dosis de DMBA 100 mg/kg en aceite de sésamo como vehículo. Se alimentaron por sonda todos los animales una vez al día con o bien una formulación de suspensión de GLN (1 g/kg/día) (AES-14) (n=16) o bien agua (n=16) durante la duración de

todo el experimento. Se examinaron los animales semanalmente para detectar desarrollo tumoral y se registraron sus pesos corporales. Se sacrificaron los animales 11 semanas tras la aplicación de DMBA y se registraron el número de tumores, el volumen y el peso tumorales. Se calcularon los volúmenes tumorales usando una fórmula convencional: anchura<sup>2</sup> x longitud x 0,52 (Ingber *et al.*, Phys. Rev., 42: 7057 (1990)), y se expresaron como centímetros cúbicos. Se usaron diez tumores de cada grupo experimental en el presente ejemplo. Se recogieron muestras de tejido, se congelaron inmediatamente en nieve carbónica y se mantuvieron a -80°C hasta que se usaron.

*Medición de GSH.* Se midió el contenido en GSH y GSSG en los tumores mediante un método de reciclaje enzimático convencional, tal como se describe por Tietze (Ann. Biochem., 27:502-522 (1969)) y modificado por Anderson (en: Glutathione, vol. 1, Dophin D (ed). Nueva York: John Wiley & Sons, págs. 340-365). En resumen, se homogeneizaron 0,5 g de tejido con 2,5 ml de ácido 5-sulfosalicílico al 5%, se midió el contenido en proteína y se centrifugaron las muestras a 5000 x g, 5°C durante 15 minutos. Se añadieron diez  $\mu$ l del sobrenadante a 1 ml de mezcla de reacción (fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido 0,2 mM, ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico 0,6 mM y 1,33 unidades de GSH reductasa) y se midió la absorbancia a 412 nm. Para determinar el contenido en disulfuro de GSH (GSSG), se mezclaron 0,5 ml del sobrenadante con 10  $\mu$ l de 2-vinilpiridina y 60  $\mu$ l de trietanolamina con el fin de eliminar GSH mediante el método de Griffith (Anal. Biochem., 106:207-212), luego se midió según los procedimientos anteriores. Se normalizaron los datos por miligramo de proteína y se expresaron como nM/mg de proteína.

*Ensayo de caspasa-3.* Se midió la actividad enzimática de la caspasa-3 en los tejidos tumorales mediante un ensayo colorimétrico de caspasa-3 (R&D System, Minneapolis, MN). En resumen, se mezclaron 100  $\mu$ g de extracto de tejido con 50  $\mu$ l de tampón de reacción y 5  $\mu$ l de sustrato de caspasa-3 DEVD, se conjugaron con cromóforo p-nitroanilina (pNA) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se midió espectrofotométricamente a 405 nm la intensidad de la reacción de color debido a la liberación de p-nitroanilida. Se restó la lectura de blanco de cada lectura de muestra antes del cálculo. Se expresan los datos como absorbancia (DO) a 405 nm.

*Extracción de ARN y detección de productos génicos mediante RT-PCR relativa.* Se aisló el ARN total mediante el kit RNeasy Mini (Qiagen, Chatsworth, CA). Se transcribió de manera inversa el ARN (1  $\mu$ g) usando Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ) y oligo (dT) (Promega, Madison, WI). Se usó ADNc de primera hebra (3  $\mu$ l) como molde para la posterior amplificación por PCR con los siguientes cebadores: caspasa-3, directo, 5' CGATGCAGCTAACCTCAGAGA (SEQ ID NO: 1), inverso, 5' CCTTCCGGTTAACACGAGTGA (SEQ ID NO:2); p21, directo: 5' GATCCTGGTGATGCCGACCT (SEQ ID NO:3), inverso: 5' GGAACCTTTGACTTCGCCACTGA (SEQ ID NO:4). Se examinaron Bax- y Bcl-2 usando el kit de PCR doble de Bax de rata y el kit de PCR doble de Bcl-2 de rata (Maxim Biotech, Inc, San Fransisco, CA). Se realizó la PCR en un total de 25  $\mu$ l con mezcla maestra de PCR Taq adquirida de Qiagen (Chatsworth, CA) y 0,20 pmol de cada cebador para la amplificación de caspasa-3 y p21 o tal como sugería el fabricante para Bax y Bcl-2. Se llevaron a cabo treinta y cinco ciclos de reacción a 94°C (60 s) y la temperatura de apareamiento apropiada (90 s), seguido por 10 min. a 72°C en un termociclador Perkin-Elmer 2400. Se cuantificó la cantidad de cada uno de los transcritos amplificando simultáneamente la unidad ribosómica 18S como control interno (Ambion, Austin, TX). Se sometió el ADNc amplificado a electroforesis en geles de agarosa al 1,5% que contenían bromuro de etidio 100 ng/ml. Al finalizar la electroforesis, se observaron los geles y se fotografiaron bajo luz UV. Se calculó la cantidad de cada transcrito en relación con los niveles de ARNr 18S amplificado a partir de la misma muestra en el mismo tubo.

*Densitometría.* Se midieron el área y la densidad de las bandas que resultaron de la RT-PCR usando el programa Scion Image para IBM (Scion Corporation). Se calculó la razón de las señales de cada gen diana y el ARNr 18S individualmente. Se expresaron los resultados como unidades arbitrarias relativas y se analizaron estadísticamente.

*Análisis estadístico.* Se realizaron comparaciones entre los grupos mediante un análisis de ANOVA de una vía usando el software estadístico StatView para Windows, versión 4.5. Se expresaron todos los datos como media  $\pm$  error estándar (EE). Resultados con P < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

#### Resultados:

*Carcinogenicidad de DMBA.* No había diferencias significativas en el peso corporal medio de los animales de ambos grupos al comienzo del estudio o en el sacrificio. Todas las ratas aumentaron de peso durante el periodo de estudio de 11 semanas. El cincuenta por ciento de las ratas en el grupo complementado con GLN no tenían tumores al final del estudio. La mayoría de los animales en este grupo tenían un único tumor, dos ratas tenían 3 tumores cada una. En el grupo que recibió agua en lugar de GLN, el 100% de las ratas desarrollaron tumores de mama y 6 de los animales tenían 3 y 4 tumores cada uno. El número total de tumores en el grupo experimental alimentado con GLN era 12, frente a 26 en el grupo alimentado con agua. El peso de los tumores en el grupo tratado con GLN varió entre 0,6 y 6 g, con un peso tumoral promedio de 3,8 g, frente a de 0,07 a 19,7 g, con un peso promedio de 3,9 g en el grupo tratado con agua.

El complemento de GLN disminuye los niveles de GSH tumoral. La disminución en los niveles del glutatión reducido era del 22% (valores medios  $\pm$  EE,  $18,00 \pm 3,713$  frente a  $22,980 \pm 3,535$ ),  $P < 0,05$  ( $P = 0,4$ ) (figura 6 panel A). Se estableció una disminución de más de un 40% en los niveles de glutatión oxidado en los tumores como resultado de la complementación con GLN (valores medios de la concentración de GSSG en  $\text{ng}/\mu\text{g}$  de proteína  $\pm$  EE,  $1,188 \pm 0,171$  en el grupo tratado con GLN frente a  $0,703 \pm 0,131$  en los tumores del grupo que recibió agua,  $P < 0,05$ ) (figura 6 panel B).

Efecto de la complementación con GLN sobre la actividad enzimática de caspasa-3. Se encontró que la actividad enzimática de caspasa-3 aumentaba significativamente en el tejido tumoral de animales tratados con GLN (valores medios  $\pm$  EE,  $0,283 \pm 0,183$  frente a  $0,140 \pm 0,035$  en unidades de densidad óptica a 405 nm,  $P < 0,05$ ) (figura 7).

GLN regulaba por disminución Bcl-2 y regulaba por incremento Bax, caspasa-3 y p21. Los resultados del análisis de expresión génica obtenidos por medio de RT-PCR relativa y análisis densitométrico cuantitativo se presentan en la figura 8. La complementación con GLN dio como resultado un 34% de inhibición de Bcl-2 en los tumores recogidos de animales que recibieron GLN en comparación con los animales que se alimentaron por sonda con agua (valores medios  $\pm$  EE,  $1265 \pm 88$  frente a  $1893 \pm 130$ , en unidades arbitrarias,  $P < 0,05$ ). Al mismo tiempo, la dieta enriquecida en GLN dio como resultado un aumento del 27% en la expresión de Bax (valores medios  $\pm$  EE,  $1371 \pm 79$  frente a  $1150 \pm 41$ , en unidades arbitrarias,  $P < 0,05$ ); del 23% en la expresión de caspasa-3 (valores medios  $\pm$  EE,  $2579 \pm 213$  frente a  $1989 \pm 141$ , en unidades arbitrarias,  $P < 0,05$ ); y del 24% en la expresión de p21 (valores medios  $\pm$  EE,  $2851 \pm 177$  frente a  $2167 \pm 161$ , en unidades arbitrarias,  $P < 0,05$ ).

#### Discusión

El foco principal de este ejemplo era sobre el efecto de GLN sobre los niveles en células tumorales de GSH y activación de la apoptosis. Los resultados han establecido que la complementación con GLN daba como resultado una disminución del 20% de GSH y una disminución del 41% en GSSG. Lo que es más importante, la disminución en GSH tumoral se correlacionaba con un aumento de casi el 50% en la actividad enzimática de caspasa-3. El aumento de actividad de caspasa-3 estaba asociado con la regulación por incremento de la expresión génica de caspasa-3 y Bax tal como se muestra mediante análisis de RT-PCR relativa. GLN regulaba por disminución la proteína antiapoptótica principal Bcl-2 en un 34% en las células cancerosas. Además, se demostró la regulación por incremento de p21, un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, que se sabe que controlan la proliferación celular.

Se ha demostrado la importancia del agotamiento de GSH en la promoción de la apoptosis en varios modelos *in vitro* (Bojes *et al.*, *Biochem J.*, 325:315-319 (1997), Ho, *et al.*, *Mol. Carcinog.*, 19: 101-113 (1997), y Roth *et al.*, *Nutrition*, 18: 217-221 (2002)). Se ha encontrado que cambios en los niveles de GSH afectan a la apoptosis mediante la regulación de la expresión de la familia de proteínas Bcl-2 (Bojes *et al.*, *Biochem J.*, 325:315-319 (1997) y Voehringer, *Free Radic. Biol. Med.*, 27: 945-950 (1999). Se ha sugerido también que el agotamiento de GSH es necesario y suficiente para inducir la liberación de citocromo c, que es el acontecimiento clave en la ruta de señalización mitocondrial apoptótica. Las alteraciones mitocondriales asociadas con la apoptosis implican la apertura de los canales y la liberación de citocromo c al citosol, que se cree que provoca la translocación de algunos de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 desde el citosol hasta las mitocondrias y da como resultado la activación de la apoptosis (Coppola *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.*, 28:56-61 (2000)). Obrador *et al.* (*Free Radic Biol. Med.*, 3:642-650 (2001) notificaron que una dieta enriquecida en GLN activaba la muerte celular apoptótica a través de un cambio en el estado redox del glutatión dentro de las mitocondrias tumorales. Tradicionalmente, no se considera GLN como un sustrato limitante de la velocidad para la síntesis de GSH, aunque GLN potencia la síntesis de GSH en células normales y no en células tumorales. En el presente ejemplo, se encontraron niveles disminuidos de GSH y GSSG en las muestras de tejido tumoral recogidas de ratas alimentadas con GLN (proteína 18  $\text{ng}/\text{mg}$  tras GLN frente a proteína 23  $\text{ng}/\text{mg}$  sin GLN). El efecto de GLN sobre los niveles de GSSG era más impresionante (disminución de más del 40% en los tumores). Sin embargo, la fuerte reducción de GSSG que se correlacionaba con el aumento de la actividad de caspasa-3 en el modelo experimental no concordaba con la sugerencia de que los niveles aumentados de GSSG estimulan la apoptosis (Celli *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 275:G749-G757 (1998)).

Varios estudios han demostrado que la complementación con GLN es beneficiosa en cirugía, cicatrización de heridas, traumatismos, SIDA y prevención de complicaciones asociadas con quimioterapia, radiación y trasplante de médula ósea (Labow *et al.*, *World Journal of Surgery*. 24: 1503-1513. (2000) y Karinch *et al.*, *Journal of Nutrition*, 131: 2535S-2577S (2001)). Varios ensayos clínicos han apuntado a la importancia de GLN en diversos estados clínicos (Piccirillo *et al.*, *Hematologica*. 88:192-200 (2003)), pero los mecanismos moleculares que están detrás de esos efectos beneficiosos de GLN todavía no están claros. Estudios *in vitro* establecieron que la privación de GLN provocaba una rápida elevación en la expresión de genes inducibles por detención del crecimiento y daños en el ADN (GADD45 y GADD153) en varias líneas celulares de mama humanas (Abcouwer *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274: 28645-28651 (1999)). Se ha encontrado que en cáncer de mama inducido por DMBA, la complementación con GLN daba como resultado la regulación por disminución de la ruta de señalización de fosfatidilinositol-3 cinasa (PI-3K)/Akt en el tejido normal que rodea al tumor (ejemplo 5).

En el modelo experimental de cáncer de mama, una única dosis de DMBA a ratas puberales induce carcinomas mamarios de origen ductal que imitan algunos aspectos del cáncer de mama humano y son un modelo adecuado para estudiar el proceso de tumorigénesis. La complementación con GLN oral inhibió significativamente el desarrollo tumoral y revertió los niveles de GSH deprimidos. Los presentes resultados indican que la complementación con GLN potencia significativamente la apoptosis de células cancerosas posiblemente a través del agotamiento de GSH. El aumento de la expresión génica de p21 sugiere también la implicación de proteínas reguladoras del ciclo celular. Este resultado concuerda con la relación establecida entre GSH y el control de los puntos de control del ciclo celular (Gansauge *et al.*, Cell Growth Differ., 9: 611-617 (1998)).

Conjuntamente, los resultados de este ejemplo sugieren que la complementación con GLN estimula la apoptosis en células cancerosas *in vivo* posiblemente a través de la reducción de GSH y la modulación de la expresión génica de miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2, y la proteína reguladora del ciclo celular p21. Estos resultados proporcionan una base para estudios adicionales para clarificar los mecanismos de acción moleculares exactos de GLN en cáncer con el fin de obtener información sobre su aplicación clínica.

Conclusiones:

El presente ejemplo estableció que la complementación con GLN reduce significativamente los niveles de GSH en tumores. Puesto que se cree que hay una fuerte correlación entre los niveles de GSH intracelulares y la apoptosis mediada por Bcl-2, se examinaron los efectos de la modulación de GSH inducida por GLN sobre la implicación de rutas apoptóticas en cáncer de mama inducido por DMBA de ratas Sprague-Dawley hembra. Once semanas después de la aplicación de DMBA, el 50% de los animales que recibieron GLN durante todo el experimento estaban libres de tumores. Una disminución significativa en los niveles de GSH y un aumento en la actividad de caspasa-3 en las células tumorales de animales que recibieron GLN. Además, este ejemplo estableció que la complementación con GLN daba como resultado la regulación por incremento de la expresión génica de caspasa-3, bax y p21 y la regulación por disminución de la expresión de Bcl-2. Globalmente, estos resultados sugieren que la complementación con GLN es un regulador crítico de la síntesis de GSH en el organismo bajo estrés catabólico e inhibe la carcinogénesis inducida por DMBA en glándulas mamarias a través de la estimulación de la apoptosis.

### Ejemplo 5

La complementación con glutamina oral inhibe la señalización por PI-3K/Akt en cáncer de mama experimental.

#### Introducción

La administración de 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) a ratas puberales provoca cáncer de mama e inhibe la producción de glutatión (GSH). Se sabe que la complementación con glutamina (GLN) oral reduce significativamente el desarrollo tumoral. Se diseñó el presente ejemplo para investigar la implicación de la ruta de señalización apoptótica de fosfatidilinositol-3 cinasa (PI-3K)/Akt activada por IGF-1.

La hipótesis detrás de este ejemplo era que el IGF-1 regulado por disminución afectaría a la señalización celular apoptótica en el tejido de glándula mamaria. El presente ejemplo establece que la complementación con GLN de la dieta alteraba significativamente la expresión de proteínas de los miembros de la cascada de señalización de PI-3K/Akt en el tejido diana, promoviendo el proceso de apoptosis.

#### Materiales y métodos

##### *Animales experimentales y tratamiento*

Se usaron un total de 40 ratas Sprague-Dawley hembra puberales fechadas con hora (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, EN) de menos de 50 días de edad y que pesaban aproximadamente 150 g. Se aprobaron todos los estudios por el Animal Care and Use Committee en el Central Arkansas Veterans Healthcare System. Se mantuvieron las ratas en jaulas convencionales en la instalación de cuidado de animales y se sometieron a un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Durante el periodo de estudio, las ratas recibieron una alimentación apareada con una dieta predefinida de alimento (TD 96163) y se les administró agua a voluntad. A la edad de 50 días, se aleatorizaron las ratas a los siguientes 4 grupos (n=16): DMBA+GLN, DMBA+agua, Aceite+GLN y Aceite+agua y recibieron una única dosis de DMBA 100 mg/kg en aceite de sésamo como vehículo o aceite de sésamo solo. Se alimentaron por sonda todos los animales una vez al día con o bien una formulación de suspensión de GLN (1 g/kg/día) (AES-14) o bien agua durante la duración de todo el experimento. Se examinaron los animales semanalmente para detectar desarrollo tumoral y se registraron sus pesos corporales. Se sacrificaron los animales 11 semanas tras la aplicación de DMBA y se registraron el número de tumores, el volumen y el peso tumorales. Se recogieron los tumores y las mamas y se congelaron inmediatamente en nieve carbónica. Se almacenaron las muestras de tejido -80°C hasta que se usaron. Se fijaron muestras de los tumores en formalina tamponada al 10%, se incrustaron en parafina, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron microscópicamente para detectar cambios morfológicos.

## Extractos proteicos

Se prepararon extractos proteicos a partir de tejido de glándula mamaria (congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) mediante homogeneización en el siguiente tampón de lisis: Tris HCl 10 mM, pH 7,6/EDTA 5 mM/NaCl 50 mM/ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  30 mM/NaF 50 mM/ $\text{Na}_3\text{VO}_4$  200  $\mu\text{M}$ /Triton-X 100 al 1% y 1 comprimido/50 ml de tampón de comprimidos de cóctel inhibidor de proteasas (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Se incubaron los homogenados a  $4^{\circ}\text{C}$  durante la noche en un agitador orbital y se centrifugaron a 14.000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Se midieron las concentraciones de proteína de los sobrenadantes usando el ensayo de proteína Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

## SDS-PAGE e inmunotransferencia

Se fraccionaron cuarenta microgramos de proteína de cada muestra en geles de poliacrilamida al 10% y se transfirieron sobre una membrana de PVDF usando un sistema de gel vertical Mini (Thermo EC, Holbrook, NY) (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, The Laboratory Press, 1987). Se tiñeron las membranas en Ponso S al 0,2% tras la transferencia con el fin de controlar la carga igualitaria de proteínas. Tras el bloqueo con leche desnatada al 5% en tampón TBS-T (Tris 100 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween 20 al 0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente, se incubaron las membranas durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  (o 2 h a temperatura ambiente) en anticuerpo primario, diluido en leche al 5% o BSA al 5% y en anticuerpo secundario marcado con HRP durante 1 hora a TA. Se verificó la carga igualitaria de proteína volviendo a estudiar con sonda las membranas con anticuerpo anti-actina  $\beta$ . Se visualizaron las proteínas usando el sistema de detección ECL (Amersham Biosci., Piscataway, NJ). Se usaron los siguientes anticuerpos primarios tal como recomiendan los fabricantes: anti-IGF-1, anti-Bcl-2 y anti-actina  $\beta$  (Santa Cruz Biotech., Inc., Santa Cruz, CA), anti-IGF-IR, anti-Akt y anti-Bad (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Se adquirieron los anticuerpos secundarios (anti-conejo, anti-ratón y anti-cabra marcados con HRP) de Santa Cruz Biotech, Inc.

## Densitometría

Se midieron el área y la densidad de las bandas que resultaron de la inmunotransferencia de tipo Western usando el programa Scion Image para IBM (Scion Corporation, Maryland, EE.UU.). Los resultados, expresados en unidades de densidad integrada/1000, se analizaron estadísticamente.

## Análisis estadístico

Se expresaron los datos como media  $\pm$  EE. Se realizaron comparaciones entre los grupos mediante análisis de ANOVA de una vía usando el software estadístico StatView para Windows, versión 4.5. Resultados con  $P < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## Resultados

No había diferencias significativas en el peso corporal medio entre los grupos al comienzo del estudio o en el sacrificio. Todas las ratas aumentaron de peso durante el periodo de estudio de 11 semanas. El cincuenta por ciento de las ratas en el grupo complementado con GLN no tenía tumores al final del estudio. Seis de los animales en este grupo desarrollaron un único tumor y dos tenían 3 tumores cada uno. En el grupo que recibió agua en lugar de glutamina, el 100% de las ratas desarrollaron tumores de mama y 6 de los animales tenían 3 y 4 tumores cada uno. El número total de tumores en el grupo experimental alimentado con GLN era 12, frente a 26 en el grupo alimentado con agua. El peso de los tumores en el grupo tratado con GLN varió entre 0,6 y 6 g, con un peso tumoral promedio de 3,8 g, frente a de 0,07 a 19,7 g, con un peso promedio de 3,9 g en el grupo tratado con agua. El estudio histológico de los tumores estableció que todos los tumores en ambos grupos eran adenocarcinoma maligno, tal como se había notificado anteriormente en el modelo de cáncer de mama (Russo *et al.*, Lab. Invest., 57: 112-137 (1987) y Fukunishi, Acta Path. Jap., 18: 51-72 (1968)).

Se determinó la expresión de proteína de IGF-1, su receptor IGF-IR, Akt, Bad y Bcl-2 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western en homogenados de extractos de tejido de mama tumoral y no tumoral. Para establecer de manera más precisa el efecto de la complementación con GLN sobre la expresión de las proteínas anteriores dentro del grupo de DMBA+GLN, se compararon sus niveles en animales que llevaban tumores (DMBA+GLN, tumores) y animales que no desarrollaron tumores (DMBA+GLN, sin tumores).

*IGF-1.* Los resultados mostraron que la complementación con GLN regulaba por disminución significativamente la expresión del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1) en el grupo tratado con DMBA en comparación con el grupo de DMBA+agua (figura 9). Se encontraron niveles de IGF-1 más de 8 veces inferiores en el grupo de DMBA+GLN-con tumores en comparación con el grupo de DMBA+agua (media  $\pm$  EE,  $238 \pm 82$  frente a  $1990 \pm 563$  en unidades de densidad integrada,  $P=0,008$ ). No se encontró expresión de IGF-1 en los animales sin tumores en el grupo de DMBA+GLN. También se estableció la reducción en la expresión de IGF-1 en el grupo control, que recibió GLN, en comparación con el grupo que se alimentó con agua (media  $\pm$  EE,  $1078 \pm 368$  frente a  $2836 \pm 1044$  en unidades de densidad integrada), aunque P para la interacción no era estadísticamente significativa  $P=0,1$ ). No se

detectó expresión de IGF-1 en el tejido tumoral.

*IGF-IR.* La complementación con GLN dio como resultado una reducción de 2 veces de la expresión de proteína del receptor de IGF-1 (IGF-IR) en tejido de mama en el grupo de DMBA+GLN en comparación con la expresión en el grupo que recibió DMBA+agua. No había diferencias en los niveles de proteína de IGF-IR en los extractos de tejido de mama de ratas que llevaban tumor tratadas con DMBA+GLN y ratas sin tumores del mismo grupo (media  $\pm$  EE, 141  $\pm$  12 frente a 142  $\pm$  32 en unidades de densidad integrada) (figura 10). Las diferencias en la expresión en ambos grupos tratados con DMBA+GLN frente al grupo de DMBA+agua (media  $\pm$  EE, 296  $\pm$  67) eran estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ). GLN provocó un aumento estadísticamente significativo en el nivel de IGF-IR en el tejido de mama del grupo control frente al grupo alimentado por sonda con agua (media  $\pm$  EE, 674  $\pm$  150 frente a 368  $\pm$  34 en unidades de densidad integrada,  $P = 0,006$ ). Los tejidos tumorales (media  $\pm$  EE, 188  $\pm$  62) mostraban una disminución estadísticamente significativa en los niveles de IGF-IR en comparación con los grupos de Aceite+GLN y Aceite+agua (tumores frente a Aceite+GLN,  $P = 0,03$ ; tumores frente a Aceite+agua,  $P = 0,02$ ). Las diferencias en los niveles de IGF-IR en los tejidos tumorales y no tumorales de los grupos de DMBA+GLN y DMBA+agua no eran estadísticamente significativas.

*Akt.* La expresión de proteína de Akt también se vio afectada significativamente en el grupo de DMBA+GLN (figura 11). La complementación con GLN provocó una reducción de casi 8 veces de la expresión de Akt (niveles de proteína Akt) en el grupo de DMBA+GLN-sin tumores, en comparación con la expresión en el grupo de DMBA+agua (media  $\pm$  EE, 1649  $\pm$  425 frente a 191  $\pm$  17,  $P < 0,05$ ) y de más de 7 veces en DMBA+GLN-con tumores (media  $\pm$  EE, 258  $\pm$  46). Se encontró un aumento de aproximadamente 2 veces en los niveles de Akt en el grupo control complementado con GLN frente al grupo de agua (media  $\pm$  EE, 2243  $\pm$  288 frente a 1253  $\pm$  291 en unidades de densidad integrada,  $P = 0,03$ ). Las muestras de tejido tumoral mostraban una reducción estadísticamente significativa en los niveles de Akt en comparación con la expresión de Akt en los otros grupos (media  $\pm$  EE, 229  $\pm$  46 en unidades de densidad integrada,  $P < 0,05$ ).

*Bcl-2.* La expresión de proteína Bcl-2 era aproximadamente 20 veces inferior en el grupo de DMBA+GLN-sin tumores que en el grupo de DMBA+agua (media  $\pm$  EE, 63  $\pm$  7,3 frente a 1253  $\pm$  214 en unidades de densidad integrada,  $P = 0,03$ ) (figura 12). Se encontró una reducción de ocho veces de Bcl-2 en el grupo de DMBA+GLN-con tumores (media  $\pm$  EE, 184,07  $\pm$  50) frente a DMBA+agua. En los grupos control, los niveles de Bcl-2 eran superiores en los animales alimentados con GLN en comparación con el grupo que recibió agua sola, pero esto no era estadísticamente significativo (media  $\pm$  EE, 757  $\pm$  147 frente a 429  $\pm$  102 en unidades de densidad integrada,  $P = 0,09$ ). Los tumores mostraban niveles de Bcl-2 inferiores que el tejido de mama del grupo de DMBA+agua y los grupos control, pero superiores que el tejido de mama de animales en el grupo de DMBA+GLN (media  $\pm$  EE, 331  $\pm$  86,8 en unidades de densidad integrada).

*Bad.* La complementación con GLN dio como resultado la regulación por incremento de la expresión de proteína Bad en el grupo de DMBA+GLN-sin tumores frente al grupo de DMBA+agua (media  $\pm$  EE, 863  $\pm$  122 frente a 565  $\pm$  114,  $P = 0,01$ ) (figura 13). Los niveles de Bad en los animales con DMBA+GLN-sin tumores eran también superiores en comparación con los niveles de animales con DMBA+GLN-con tumores (media  $\pm$  EE, 376  $\pm$  116) ( $P < 0,05$ ). No había diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Bad en los grupos control (media  $\pm$  EE, 266  $\pm$  57 para Aceite+GLN, 308  $\pm$  55 para Aceite+agua). El tejido tumoral (media  $\pm$  EE, 221  $\pm$  33 en unidades de densidad integrada) no mostraba alteraciones significativas en la expresión de Bad en comparación con los grupos control.

#### 45 Discusión

En un modelo experimental de cáncer de mama, conocido como modelo de Huggins, una única dosis de DMBA a ratas puberales induce carcinomas mamarios de origen ductal en el 100% de los animales aproximadamente 11 semanas después de la aplicación de DMBA (Russo *et al.*, Lab. Invest., 57: 112-137 (1987)). DMBA (un hidrocarburo aromático policíclico) se metaboliza a través de una oxidación produciendo un diol-epóxido, que se une al ADN, creando mutaciones puntuales (Fukunishi, Acta Path. Jap., 18: 51-72 (1968)). Los resultados del ejemplo 3 mostraron que la complementación con GLN oral reducía significativamente el desarrollo tumoral inducido por DMBA y estimulaba la síntesis de glutatión (GSH) intestinal deprimida que resulta del crecimiento tumoral. GLN está asociada con regulación por incremento de la actividad de células NK disminuida y los niveles disminuidos de IGF-1 y TGF-beta en la circulación (Farr *et al.*, JPEN, 18(6): 471-476 (1994), Feng *et al.*, Surg. Forum, XLVII: 524-526 (1996) y Cao *et al.*, J Surg. Res., 100: 135-140 (2001)). Aunque los mecanismos que subyacen a estos efectos de la GLN de la dieta no se conocen, podría sugerirse la implicación de sistema(s) de señalización apoptótica. Los presentes resultados muestran que la GLN de la dieta regulaba por disminución significativamente la expresión de proteína de IGF-1, su receptor IGF-IR y la ruta de señalización apoptótica Akt en el tejido de glándula mamaria. El efecto más impresionante de GLN era la fuerte regulación por incremento de la proteína proapoptótica Bad en los animales que no desarrollan tumores como resultado del tratamiento con DMBA en comparación con animales que llevan tumores del mismo grupo. Los niveles tisulares elevados de Bad indican la estimulación de la apoptosis como efecto contrario a la tumorigénesis inducida por DMBA, dando como resultado la inhibición del desarrollo tumoral.

65 Se ha postulado que el efecto inhibitor de GLN sobre el crecimiento tumoral se produce mediante estimulación de la producción de glutatión (GSH) (Farr *et al.*, JPEN, 18(6): 471-476 (1994)). GSH es el antioxidante más abundante en

la célula y desempeña un papel crucial en la detoxificación de xenobióticos carcinogénicos impidiendo de ese modo la formación de aductos de DNA (Karinch *et al.*, Journal of Nutrition. 131: 2535S-2577S (2001)). En células, el glutatión existe normalmente en su forma reducida (tiol) (GSH) y en cantidades menores (<10%) como disulfuro de glutatión (GSSG) (Abcouwer *et al.*, J. de Biol. Chem., 274: 28645-28651 (1999)). Su acción protectora se basa en la oxidación del grupo tiol de su residuo de cisteína, que da como resultado la formación de GSSG; que a su vez se reduce catalíticamente de nuevo a GSH mediante glutatión reductasa. El agotamiento del GSH es necesario y suficiente para inducir la liberación de citocromo c, que es el acontecimiento clave en la ruta de señalización mitocondrial apoptótica. Las alteraciones mitocondriales asociadas con la apoptosis implican la apertura de canales y la liberación de citocromo c al citosol, que parece provocar la translocación de algunos de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 desde el citosol hasta las mitocondrias y da como resultado la activación de la apoptosis (Larsson *et al.*, 8 edn. Nueva York: Mc Gray Hill, 2001).

El presente estudio estableció que la complementación con GLN modulaba las proteínas relacionadas con la apoptosis Bcl-2 y Bax.

Conclusiones:

La complementación con GLN dio como resultado una disminución significativa en los niveles de IGF-1, IGF-IR, Akt y Bcl-2 en muestras no tumorales. Al mismo tiempo, los niveles de proteína proapoptótica Bad estaban significativamente elevados. Las muestras recogidas de tejidos tumorales mostraban niveles inferiores de IGF-1, Akt, Bcl-2, Bad y IGF-IR en comparación con no tumorales. La complementación con GLN inhibió la ruta de PI-3K/Akt que se cree que es importante en el aumento de la supervivencia tumoral durante la tumorigénesis. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que GLN contrarresta los efectos de DMBA y bloquea la carcinogénesis *in vivo*.

#### Ejemplo 6

Efecto de DMBA sobre el transporte de glutatión.

Introducción: La ingesta oral de 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) provoca carcinomas mamarios en ratas experimentales y está asociada con una producción de glutatión (GSH) intestinal deprimida y una marcada disminución en los niveles de glutatión portales. Por tanto, se plantea la hipótesis de que DMBA provoca inhibición en el transporte de GSH a través de la membrana basolateral del yeyuno y por tanto reduce el flujo de salida de GSH. Con el fin de demostrar esta hipótesis, se examinó el transporte de GSH a través de las vesículas de la membrana basolateral del yeyuno.

Métodos: Se investigó el transporte de GSH en las vesículas de la membrana basolateral (BLMV) del yeyuno en ratas Sprague-Dawley tratadas con una única dosis de DMBA 100 mg/kg (n=15) o aceite de sésamo (n=15) como controles. Los animales recibieron alimentación apareada con alimento predefinido y se les administró agua a voluntad. Se sacrificaron todas las ratas una semana después de la administración de DMBA. Se prepararon vesículas de la membrana basolateral (BLMV) del yeyuno usando la técnica de centrifugación diferencial en sílice recubierto con PVP coloidal Percoll. Se llevaron a cabo todas las etapas a 2-4°C. Se homogeneizaron raspados de mucosa de yeyuno en tampón de aislamiento que contiene sacarosa 180 mM/Tris 2 mM que se ajusta a pH 7,40 mediante Hepes 2 mM usando un homogeneizador Polytron (Brinkman, Rexdale, ON), en el parámetro de 2 a 6 luego de 6 a 2, a lo largo de 55 segundos. Se centrifugó el homogenado durante 10 minutos a 1000 g. Se filtró el sobrenadante a través de cuatro capas de gasa y se recogió. Se centrifugó entonces el sobrenadante que contenía material de membrana basolateral 15 minutos a 22.000 g. Se separó por lavado cuidadosamente la parte superior de sedimento empaquetado de manera suelta, se aspiró y se suspendió hasta 12 ml en tampón de aislamiento. Se añadieron 1,4 ml de Percoll y se agitó suavemente durante 20 minutos. Se centrifugó esta suspensión 35 minutos a 42.000 g. Se formaron dos bandas. Se recogieron los 2,4 ml superiores del gradiente que contenía membrana basolateral y se diluyeron con tampón de lavado, que está compuesto por KCl 60 mM/sacarosa 60 mM/Tris 2 mM que se ajusta a pH 7,40 con Hepes 2 mM. De nuevo, se centrifugó esta suspensión durante 90 minutos a 60.000 g. Se separó por lavado cuidadosamente la fracción de membrana de la parte superior del sedimento de Percoll con tampón de lavado. Se tituló esta suspensión final hasta una concentración de proteína de 12-15 ug/ul con tampón de lavado para su investigación adicional. Se determinó la concentración de proteína mediante el ensayo de proteína Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Se midió la captación de [<sup>3</sup>H]glutatión mediante una técnica de filtración/mezclado rápida. Se colocaron 40 ul de tampón de captación radiactivo en la parte inferior de un tubo de cultivo de vidrio de borosilicato de 12x75 mm (Fisher scientific). Para iniciar la reacción de unión, se añadieron 20 ul de vesículas de membrana y se hicieron vibrar rápidamente durante 8 segundos controlados por un cronómetro (Gralab Instruments, Centerville, Ohio). Al final de los 8 segundos, se añadió 1 ml de tampón de detención que contenía NaCl 150 mM/Hepes 10 mM/Tris 10 mM. Se retiró por aspiración toda la disolución y se descargó sobre un filtro en un aparato de vacío/captación. Se lavó la membrana de filtro con otros 9 ml de tampón de detención frío. Se retiraron las membranas de filtro extrayendo la membrana basolateral y se colocó en viales de centelleo. Se añadieron tres ml de Aquasol (Packard BioScience, Meriden, CT) a los viales y se mantuvieron los viales a temperatura ambiente durante 16 horas hasta que se disolvió la membrana de filtro. Se contaron todos los viales con el sistema de centelleo líquido LSI 801

(Beckman coulter, Fullerton, CA).

Resultados: Los resultados mostraron que DMBA provocaba la inhibición de la captación de GSH en las vesículas de la membrana basolateral del yeyuno, lo que demostró que el sistema de transportador de aminoácidos dependiente de  $\text{Na}^+$ , definido como sistema ASC/B<sup>0</sup> (Bode, BP (2001) J. Nutrition 131: 2539S-2542S) se inhibía mediante la administración de DMBA. La tasa de captación de GSH total por BLMV en el grupo de DMBA (figura 14) disminuyó en un 42% en comparación con el grupo control. La concentración de GSH sanguínea portal (figura 15) disminuyó en un 34% y la GSH de la mucosa del intestino (figura 28) aumentó dos veces.

Conclusiones: Tanto el transporte de GSH como la concentración de GSH portal en ratas alimentadas por sonda con DMBA disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ , prueba de la t para datos independientes). Uno de los mecanismos mediante los cuales DMBA disminuye la liberación de GSH intestinal e induce carcinogénesis podría ser a través de la depresión significativa del flujo de salida de GSH debido a una inhibición del sistema de transporte de GSH. La disminución del flujo de salida de GSH intestinal y los niveles de GSH portales potencia el desarrollo de aducto de ADN en el hígado que da como resultado la carcinogénesis. Se ha mostrado que GLN supera la depresión del flujo de salida de GSH probablemente a través de este mecanismo de transporte.

### Ejemplo 7

Efecto de glutamina (AES-14) sobre la actividad enzimática en el ciclo de gamma-glutamilo.

Se encontró que la glutamina oral (GLN) (AES-14) disminuía el desarrollo tumoral en el modelo de cáncer de mama inducido por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA). Esto estaba asociado con un aumento significativo de los niveles de glutatión (GSH) en los tejidos normales del huésped y una disminución en el nivel de GSH en tumores. En la síntesis de GSH, que implica el ciclo de gamma-glutamilo, hay dos enzimas clave:  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (GT), que transporta aminoácidos para proporcionar sustratos para la síntesis de GSH, y  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa (GCS), que es la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de GSH. Se planteó la hipótesis de que GLN oral afectaría de manera diferencial a estas enzimas con el fin de restaurar el GSH del huésped y agotar el GSH tumoral.

Métodos: Se aleatorizaron ratas Sprague-Dawley hembra a seis grupos: DMBA+GLN, DMBA+FA, DMBA+H<sub>2</sub>O, Aceite+GLN, Aceite+FA, Aceite+H<sub>2</sub>O. A la edad de 50 días, las ratas recibieron una única dosis de DMBA 100 mg/kg o aceite de sésamo y se alimentaron por sonda aleatoriamente con GLN (AES-14) (1 g/kg/día) o una cantidad isonitrogenada de Freamine (FA) o agua (H<sub>2</sub>O) mediante sonda nasogástrica comenzando 1 semana antes de la dosificación de DMBA hasta el sacrificio. Se recogieron tejidos tumoral y de mucosa de yeyuno y se sometieron a ensayo para determinar la actividad de GT y GCS. Se determinó la actividad de GT usando el método de Wahlefeld y Bergmeyer (Wahlefeld AW, Bergmeyer HU: Routine method. En Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M eds. Methods of enzymatic analysis, 3ª edición, vol. III, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield beach, Florida. 1983, p. 352). En resumen, se homogeneizaron 0,1 g de tejido en 5 volúmenes de tampón de homogeneización (Tris/HCl 100 mM, cloruro de sodio 150 mM, tritonX-100 al 0,1% v/v, pH=8) usando un homogeneizador PowderGen 125. Se añadió el homogenado a una mezcla de sustratos enzimáticos (L- $\gamma$ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida 2,9mM; pH 7-7,5 y Tris/glicilglicina 100 mM, pH 8,25). Se monitorizó el aumento en la absorción de manera continua a 405 nm durante 3 min. Se determinó la concentración de proteína mediante el ensayo de proteína BioRad.

Se calculó la actividad de GT usando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de GT (U / mg de proteína)} = \frac{\text{Tasa} \times \text{TV} \times 1000}{\epsilon \times \text{SV} \times \text{LP} \times \text{PC}}$$

en la que

Tasa = Cambio en la absorbancia por minuto a 405 nm ( $\Delta\text{ABS}/\text{min.}$ )

TV = Volumen de mezcla de reacción total (ml)

SV = Volumen de muestra (ml)

LP = Trayectoria de la luz (10 mm en este caso)

PC = Concentración de proteína (mg de proteína/l)

$\epsilon$  = Absortividad milimolar de cana a 405 (0,951  $\Delta\text{ABS}/\text{mmol}/\text{l}/\text{mm}$  en este caso)

1000 = Convierte unidades de milimol en unidades de micromol

Se definió una unidad de actividad de GT como la cantidad de enzima que catalizaría la formación de un micromol de 3-carboxi-4-nitroanilina (cana) por minuto en las condiciones del procedimiento de ensayo.

5 Se midió la actividad de GCS usando los métodos de Sekura y Meister (Sekura, R., *et al.* (1977) J. Biol. Chem. 252:2599) y Taussky y Shorr (Taussky, H.H., *et al.* (1953) J. Biol. Chem. 202:675). Se homogeneizó el tejido (0,1 g) en una disolución de homogeneización (cloruro de potasio 150 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM y cloruro de magnesio 1 mM) a una razón de 1:5 (p/v). Se añadieron diez  $\mu$ l del homogenado a 0,5 ml de una mezcla de reacción, que contenía L-glutamato de sodio 10 mM, L- $\alpha$ -aminobutirato 10 mM, cloruro de magnesio 20 mM, ATP sódico 5 mM, EDTA sódico 2 mM, tampón Tris/HCl 100 mM pH 8,2, y 10  $\mu$ g de albúmina sérica bovina y se incubaron durante 10 30 min. a 37°C en un baño de agua con agitación. Se terminó la reacción añadiendo 0,5 ml de ácido tricloroacético al 10%. Se centrifugó la mezcla a 1500 RPM, 4°C durante 10 min. y se añadieron 100  $\mu$ l del sobrenadante a 0,5 ml de ácido tricloroacético al 12,6% y 0,4 ml de reactivo de Fe (molibdato de amonio al 10%, sulfato ferroso al 5% en ácido sulfúrico 10 N) y se midió la densidad óptica a 720 nm. Se usó una curva patrón para determinar la concentración de fosfato inorgánico. Se midió la concentración de proteína de cada muestra mediante el ensayo de proteína BioRad. 15 Se calculó la actividad de la enzima  $\gamma$ -GCS con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de GCS} = \frac{ABS_{RXN} - ABS_{BL}}{\text{Pendiente} \times PC}$$

en la que

20  $ABS_{RXN}$  = la absorbancia de la muestra tras la reacción a 720 nm

$ABS_{BL}$  = la absorbancia del control a 720 nm

25 Pendiente = la pendiente de la curva patrón

PC = la concentración de proteína del homogenado de muestra

30 Se expresó la actividad de la enzima GCS como microgramos de fosfato inorgánico formado por miligramos de proteína.

Resultados: GLN oral aumentó significativamente la actividad de GT y GCS del tejido del huésped pero inhibió la actividad de GT y GCS del tejido tumoral (figuras 17 y 18).

35 Conclusiones: GLN oral estimula la síntesis de GSH en el huésped a través de regulación por incremento de la actividad enzimática de GT y GCS. Al mismo tiempo, GLN provoca una disminución en la síntesis de GSH tumoral a través de la reducción de la actividad enzimática de estas enzimas clave. La reducción del GSH tumoral hace que las células cancerosas sean más susceptibles a la radiación y la quimioterapia mientras que el aumento en el GSH del huésped hace que el paciente sea menos susceptible al daño de tejidos normales. Este efecto diferencial da como resultado una ventana terapéutica ampliada y un posible aumento en la supervivencia del huésped. 40

### Ejemplo 8

45 Efecto de la complementación con glutamina sobre la citotoxicidad de células citotóxicas naturales a lo largo del tiempo.

Se planteó la hipótesis de que la glutamina puede actuar previniendo el cáncer inducido por DMBA mediante la reversión de la depresión de la citotoxicidad de células citotóxicas naturales (NK) inducida por DMBA notificada anteriormente.

50 Métodos:

Se trataron ratas como en el ejemplo 5.

55 Se midió la citotoxicidad de células NK tal como sigue: Se trituraron bazos extirpados de manera aséptica usando un bisturí estéril, y se extrajeron linfocitos de la cápsula esplénica con RPMI 1640 caliente (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY). Se vertieron las células resultantes en tubos cónicos de 50 ml, que se llenaron con cloruro de amonio (0,83%) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) para lisar los glóbulos rojos. Se centrifugó entonces la disolución de células durante 10 minutos a 1000 rpm. Se decantó el sobrenadante, y se agitó con vórtex 60 el sedimento de células con RPMI (sin GLN) y se centrifugó de nuevo. A continuación, se resuspendieron las células en aproximadamente 10 ml de RPMI que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS) (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY) complementado con GLN al 1%. Se colocó esta suspensión de células en placas de Petri y se incubaron en un 6% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 30 minutos. Tras la incubación para garantizar la adherencia de los

5 monocitos, se contaron los linfocitos no adherentes (1:1 con tinción de cristal violeta). Se incubaron aproximadamente  $7 \times 10^6$  células totales de cada bazo durante 3 días en RPMI que contenía FBS al 10% e IL-2 humana recombinante (500 U/ml). Se usó esta suspensión de células para la determinación de la citotoxicidad de células NK mediante un ensayo de liberación de cromo-51 con la línea de células tumorales de ratón sensible a células NK, YAC-1. La citotoxicidad de NK se expresa en unidades líticas (UL). UL se define como el número de células efectoras por  $10^6$  que median un 20% de lisis de células diana. El cálculo de la actividad de NK se expresa según la siguiente ecuación:

$$10 \text{ Porcentaje de lisis específica (\%)} = \frac{\text{Liberación experimental} - \text{liberación espontánea}}{\text{Liberación máxima} - \text{liberación espontánea}} \times 100$$

10 Resultados:

15 La actividad de células NK era inferior en el grupo de DMBA sólo en la semana 1 y la semana 11 (figura 19). En la semana 2, había una elevación significativa no explicada de la citotoxicidad de células NK en el grupo de DMBA con respecto a la de controles sin DMBA. Gln oral revertió completamente esto último pero no la depresión temprana de la actividad de células NK. Sin embargo, Gln oral revertió parcialmente la depresión inducida por DMBA de la actividad de células NK en la semana 1 también.

(Lista de secuencias en página siguiente)

**Lista de secuencias**

5	<110> Klimberg, V.S. Petit, R.G. Shinal, E.C.	
	<120> Tratamiento mejorado del cáncer con glutamina	
10	<130> Documento 781.020WO1	
	<150> Documento US 60/400.446	
	<151> 01-08-2002	
15	<160> 4	
	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
	<400> 1	
	cgatgcagct aacctcagag a	21
25	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
30	<400> 2	
	ccttccggtt aacacgagtg a	21
35	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
40	<400> 3	
	gatcctggtg atgtccgacc t	21
45	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
	<400> 4	
	ggaactttga cttcgccact ga	22

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de glutamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la preparación de un medicamento para la prevención de la metástasis en un sujeto mamífero aquejado de cáncer.
2. Uso de glutamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la preparación de un medicamento oral para la prevención de recidiva del cáncer en un sujeto mamífero en remisión del cáncer o que está sometiéndose a terapia anticancerígena.
- 10 3. Uso de glutamina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma e hidrato de carbono en la preparación de un medicamento oral para inhibir la aparición de cáncer en un sujeto mamífero en riesgo de desarrollar cáncer, en el que la razón en peso de hidrato de carbono total con respecto a glutamina en el medicamento es de 0,5:1 a 50:1.
- 15 4. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el medicamento también comprende hidrato de carbono en donde la razón en peso de hidrato de carbono total con respecto a glutamina en el medicamento es de 0,5:1 a 50:1.
- 20 5. Uso según la reivindicación 3 ó 4, en el que el hidrato de carbono comprende uno o más monosacáridos o disacáridos.
6. Uso según la reivindicación 3 ó 4, en el que el hidrato de carbono comprende un alcohol de azúcar.
- 25 7. Uso según la reivindicación 1, 2, 3 ó 4, en el que el medicamento comprende no más de 5 aminoácidos que se producen de manera natural distintos de glutamina.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que el medicamento no comprende aminoácidos que se producen de manera natural distintos de glutamina.

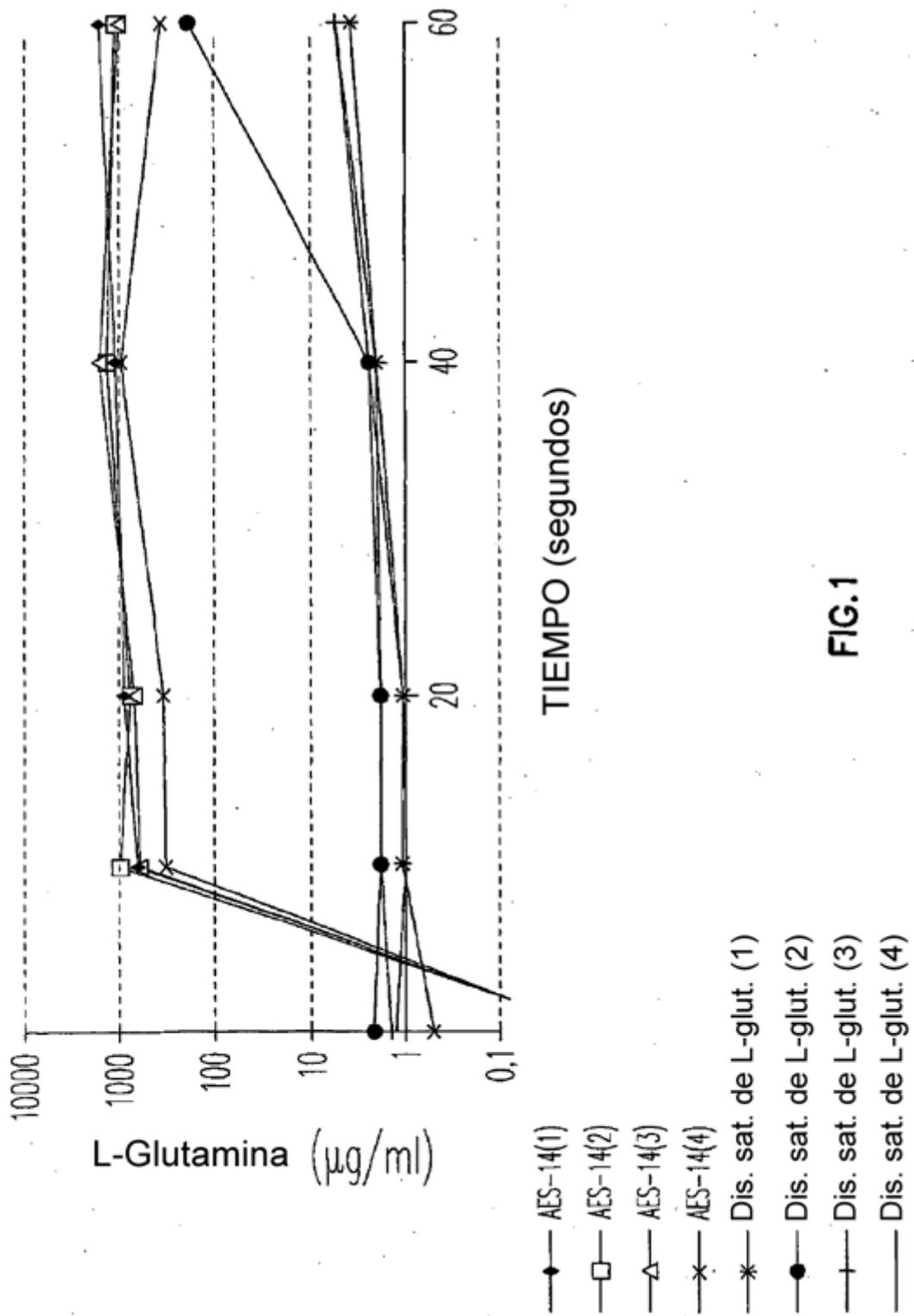


FIG.1

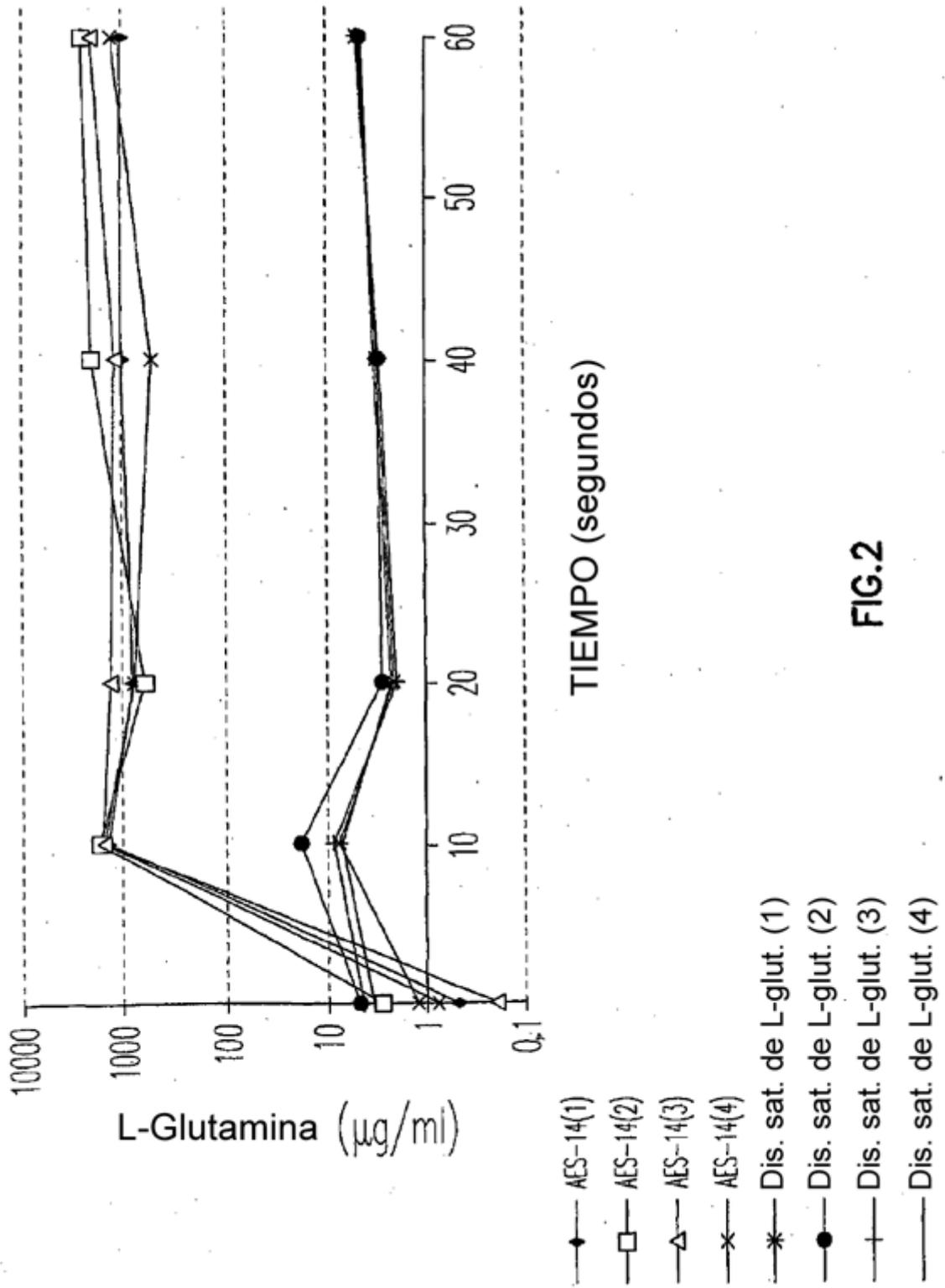
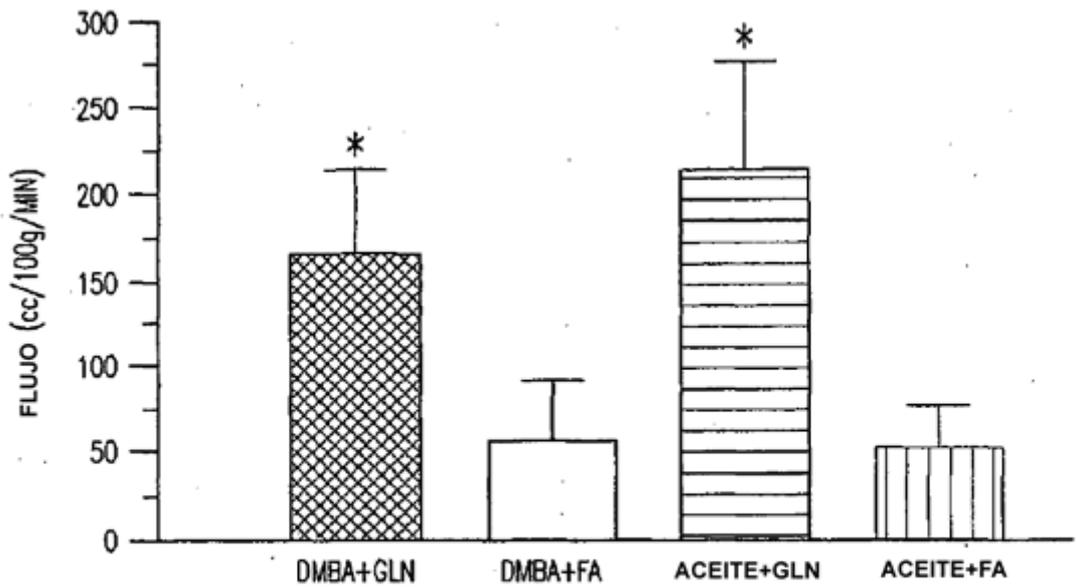
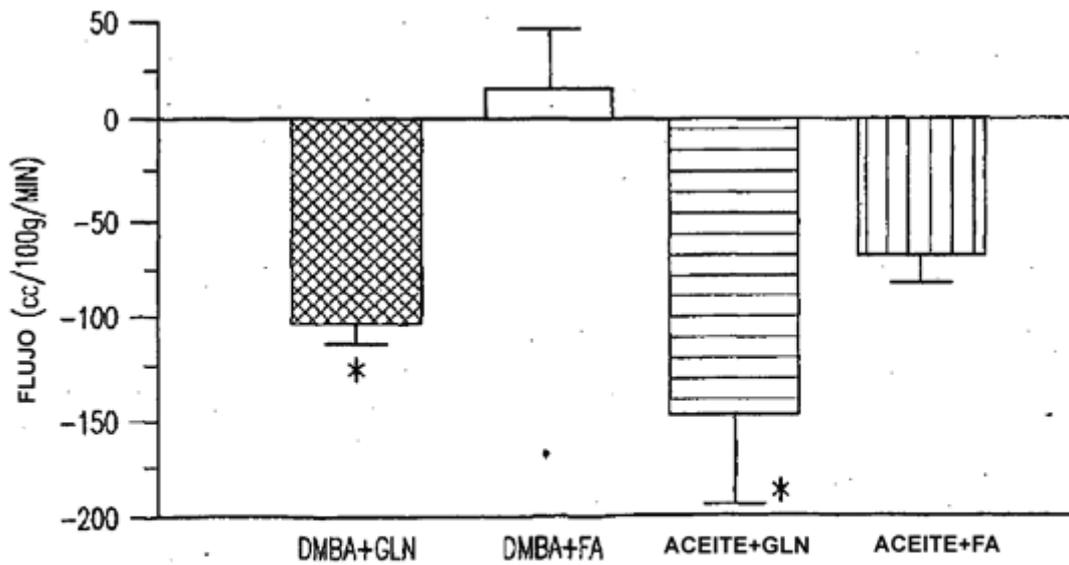


FIG.2



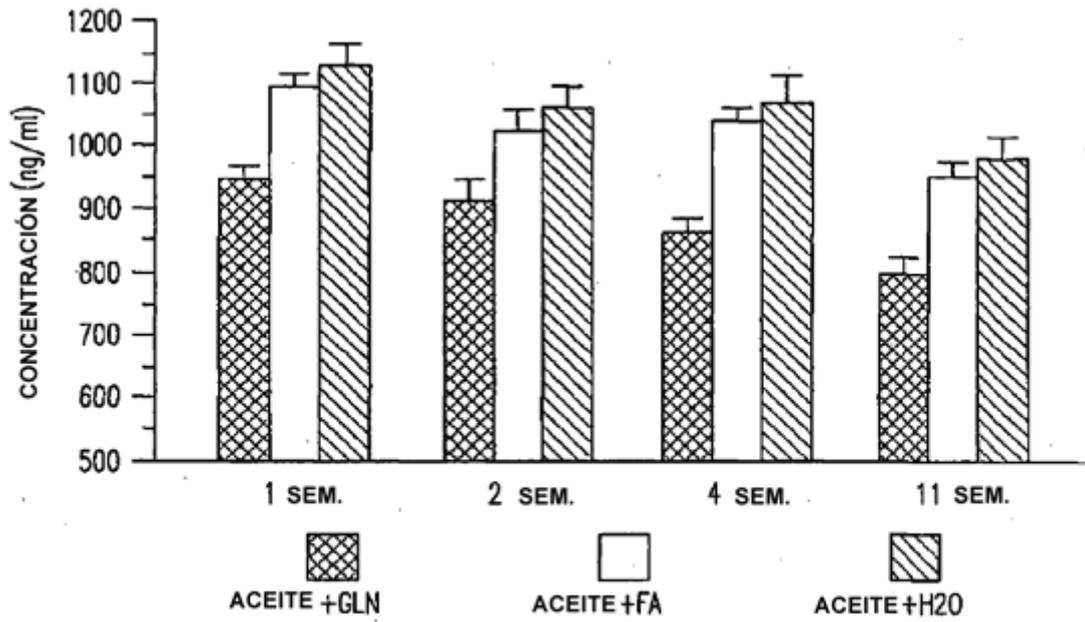
\*p<0,05, GLN frente a FA, +/- EEM, PRUEBA DE LA T PARA DATOS INDEPENDIENTES

**FIG. 3A**



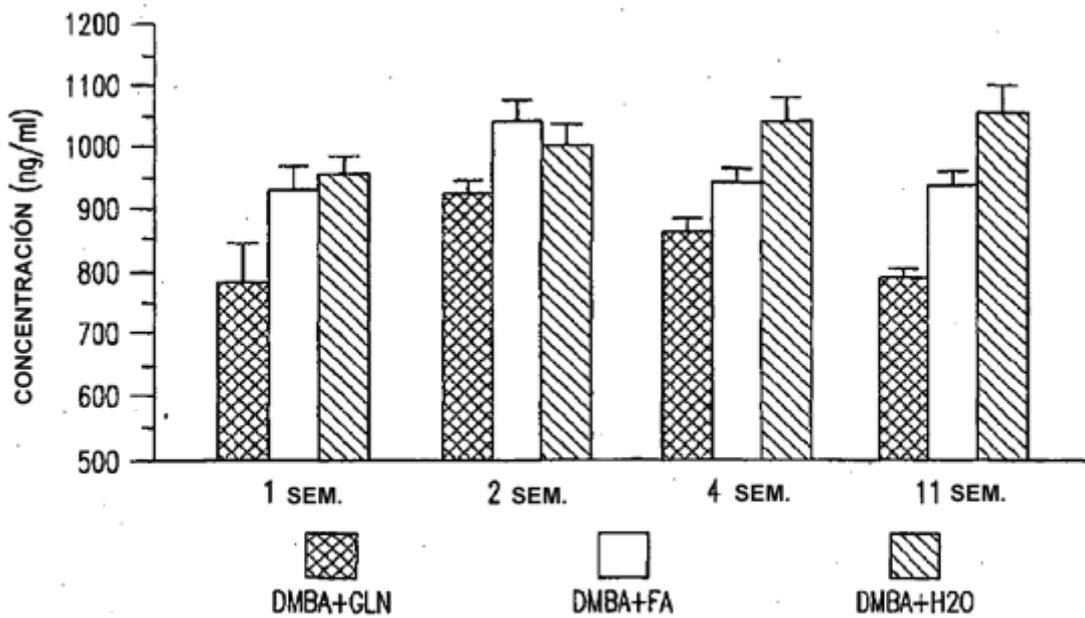
\*p<0,05, GLN frente a FA, +/- EEM, PRUEBA DE LA T PARA DATOS INDEPENDIENTES

**FIG. 3B**



\*p<0,05, ANOVA, ACEITE +GLN frente a ACEITE+FA O ACEITE+H2O

**FIG. 4**



\*p<0,05, ANOVA, DMBA+GLN frente a DMBA+FA O DMBA+H2O

**FIG. 5**

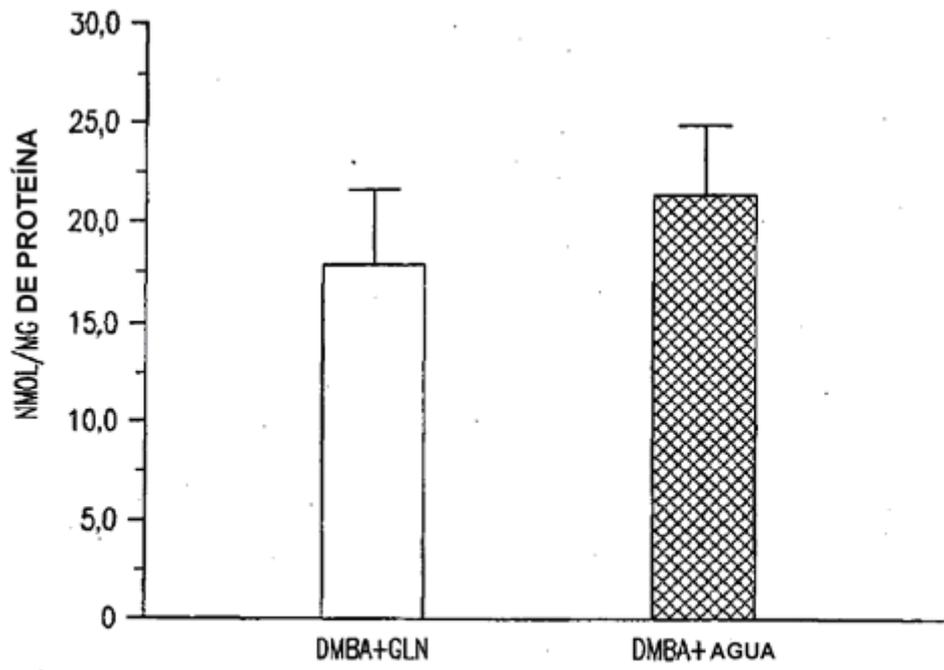


FIG. 6A

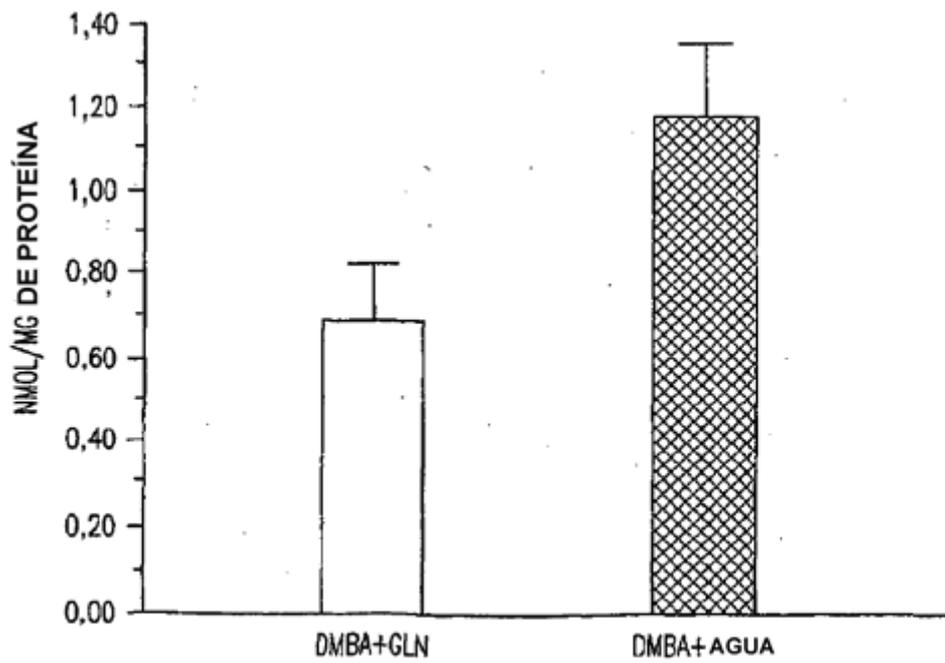


FIG. 6B

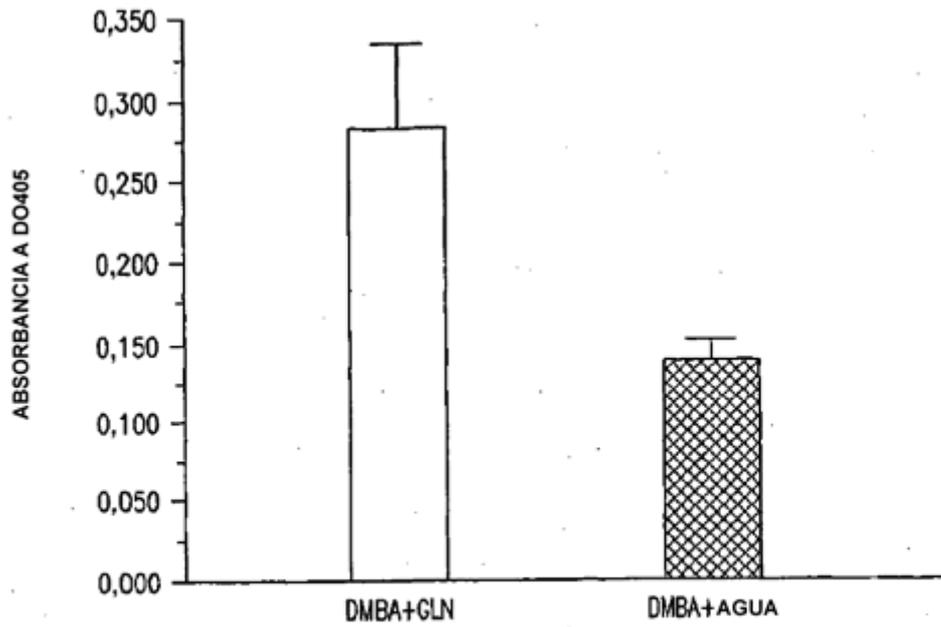


FIG. 7

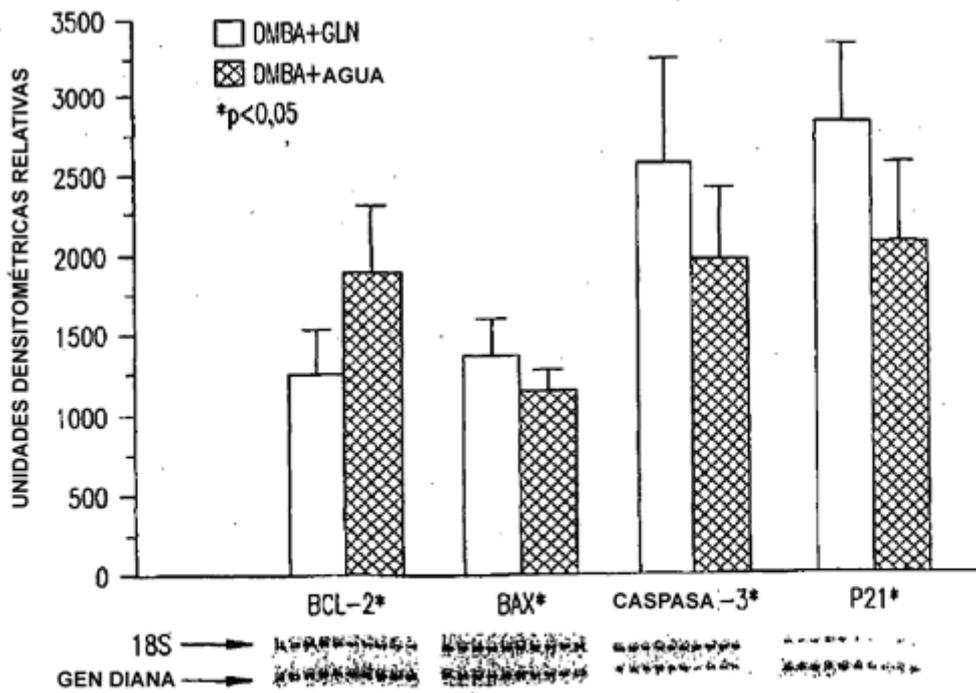


FIG. 8

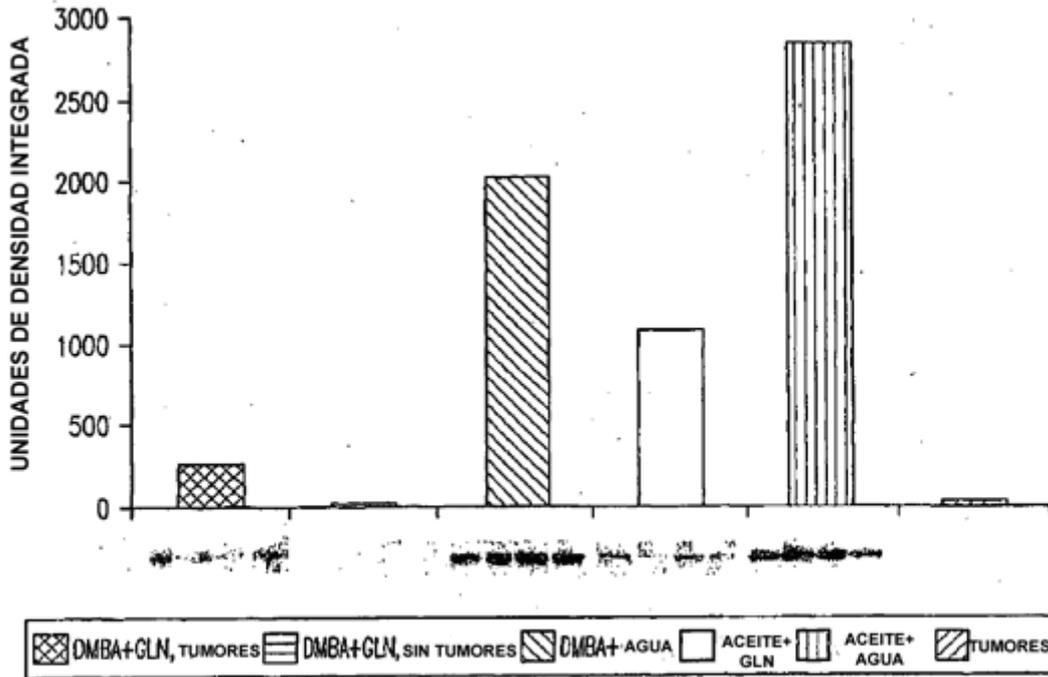


FIG. 9

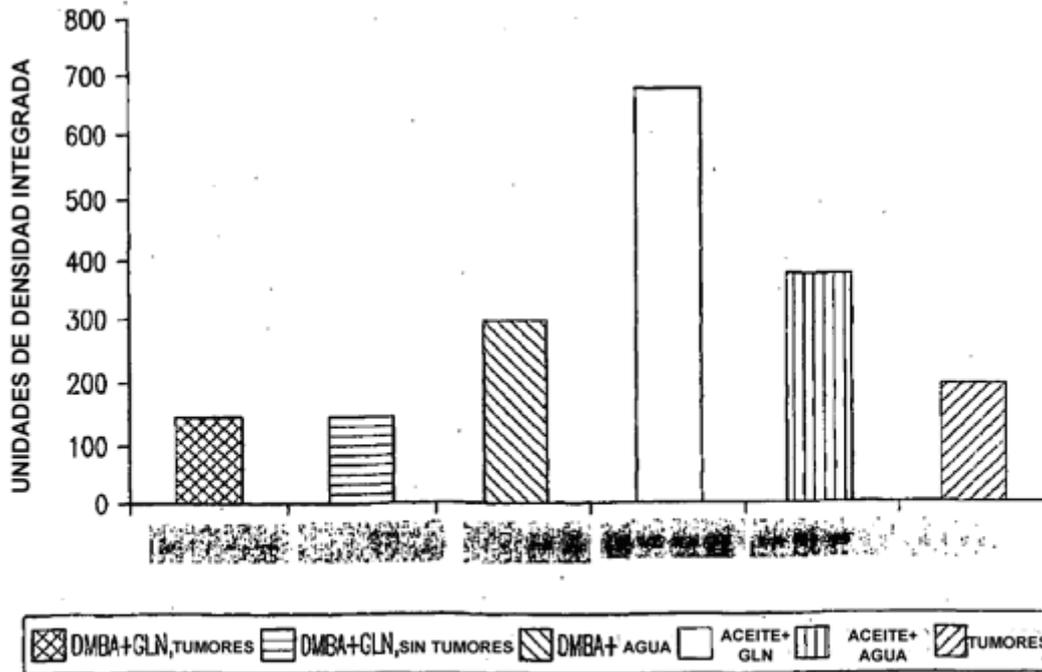


FIG. 10

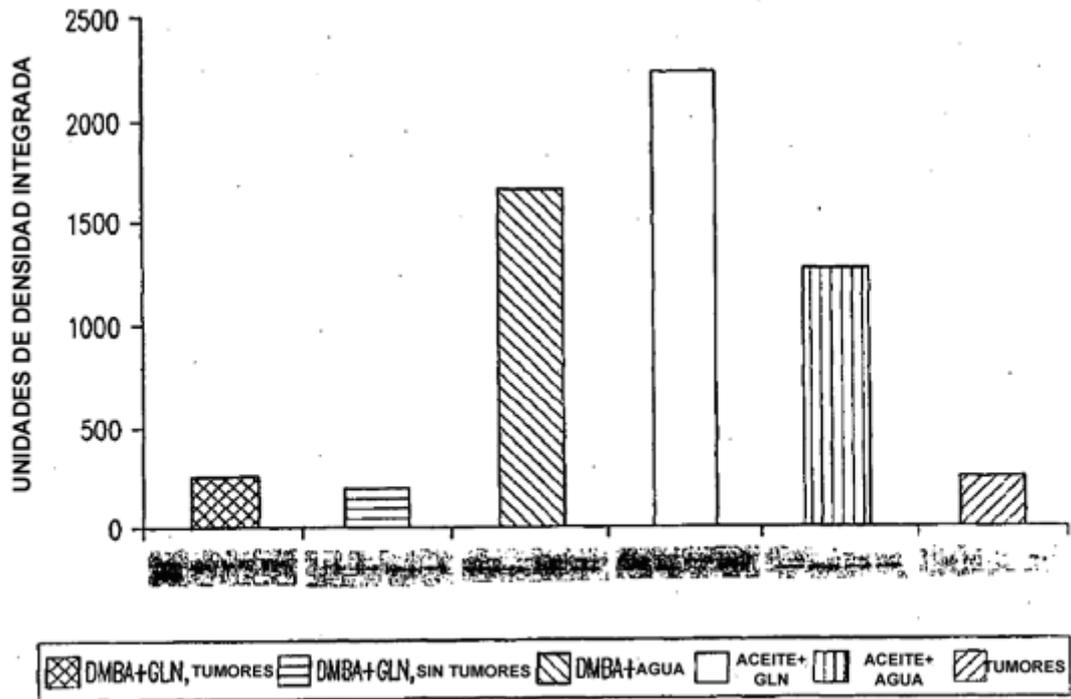


FIG. 11

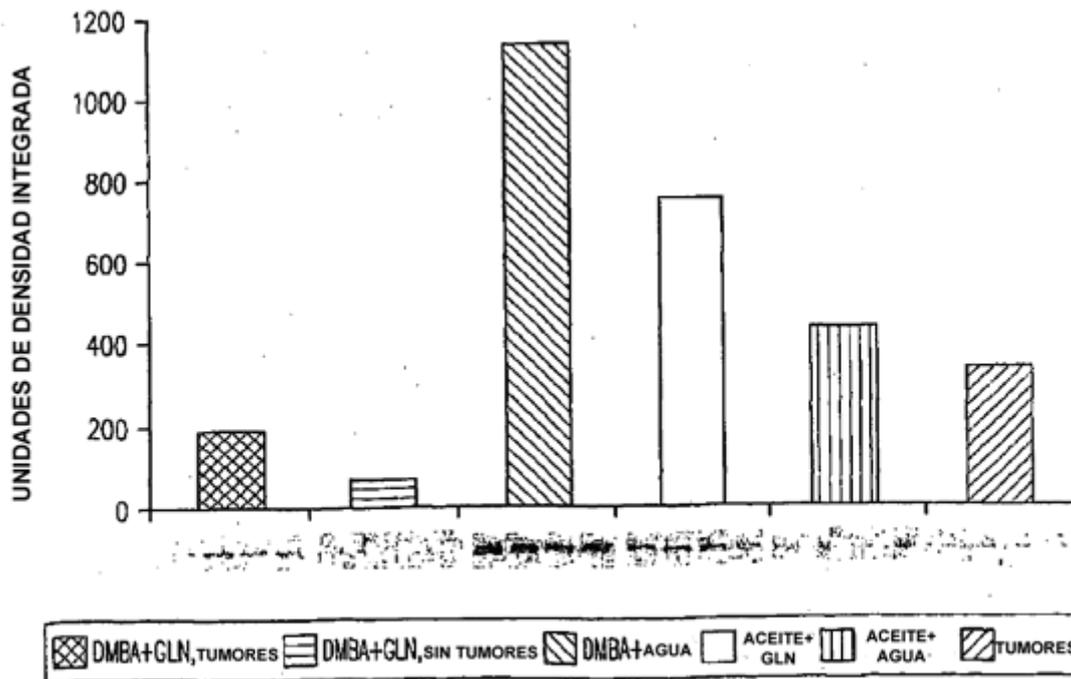


FIG. 12

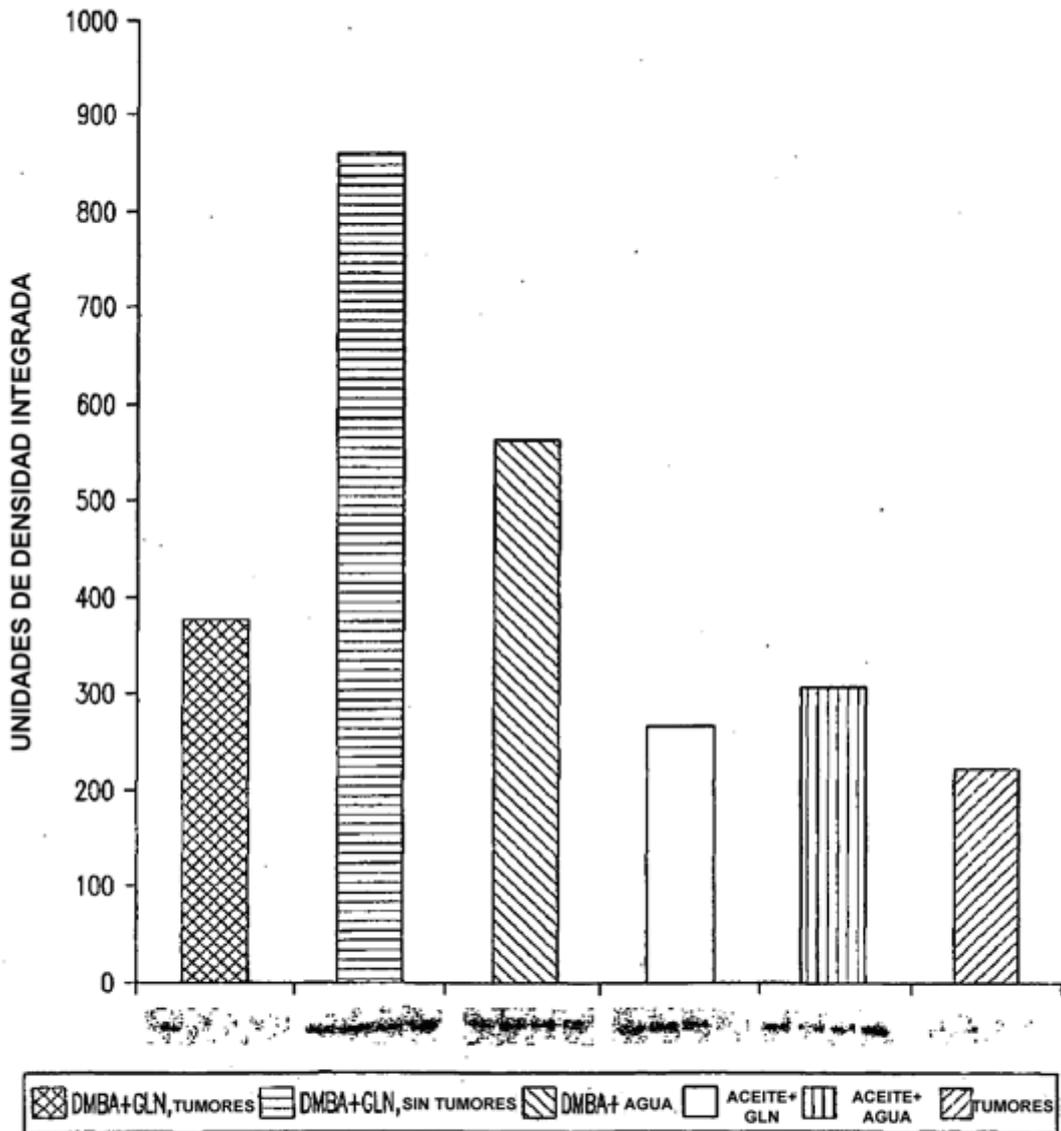


FIG. 13

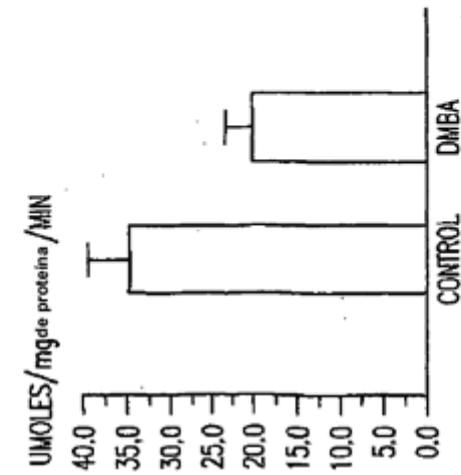


FIG. 14

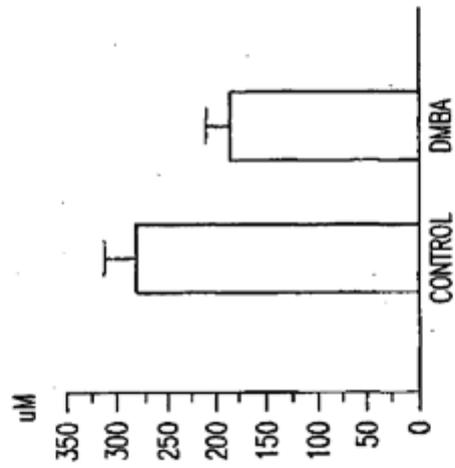


FIG. 15

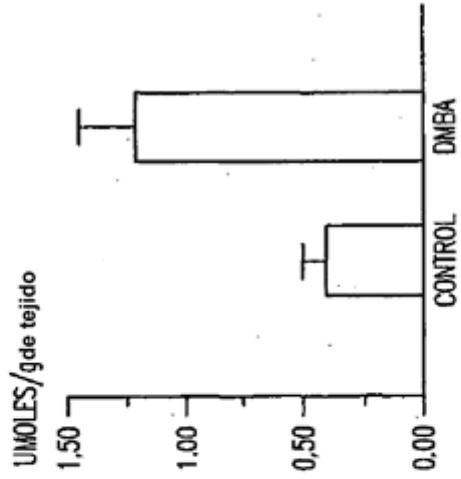


FIG. 16

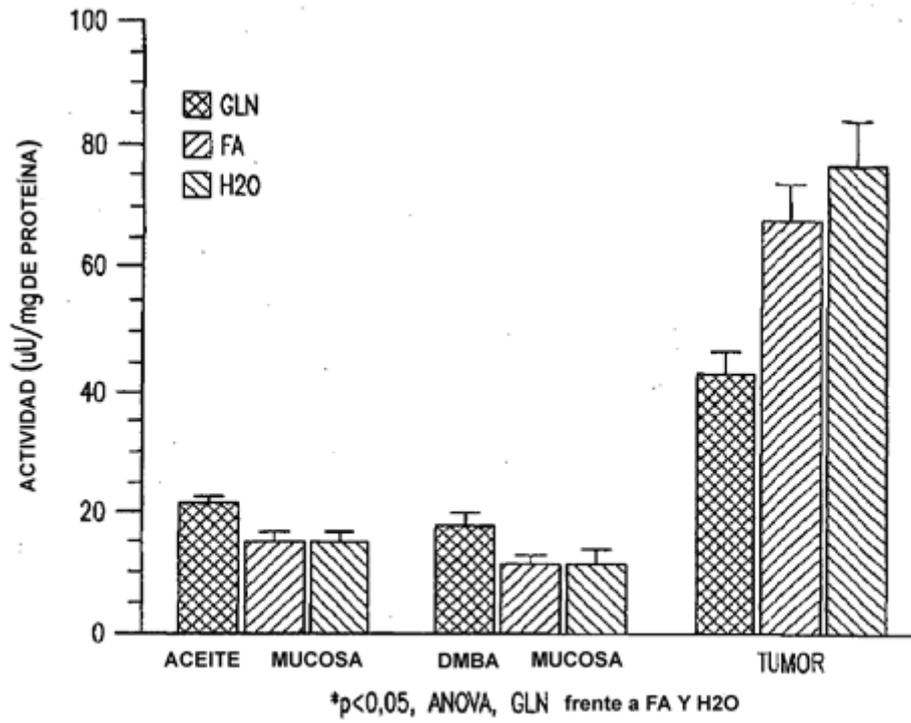


FIG. 17

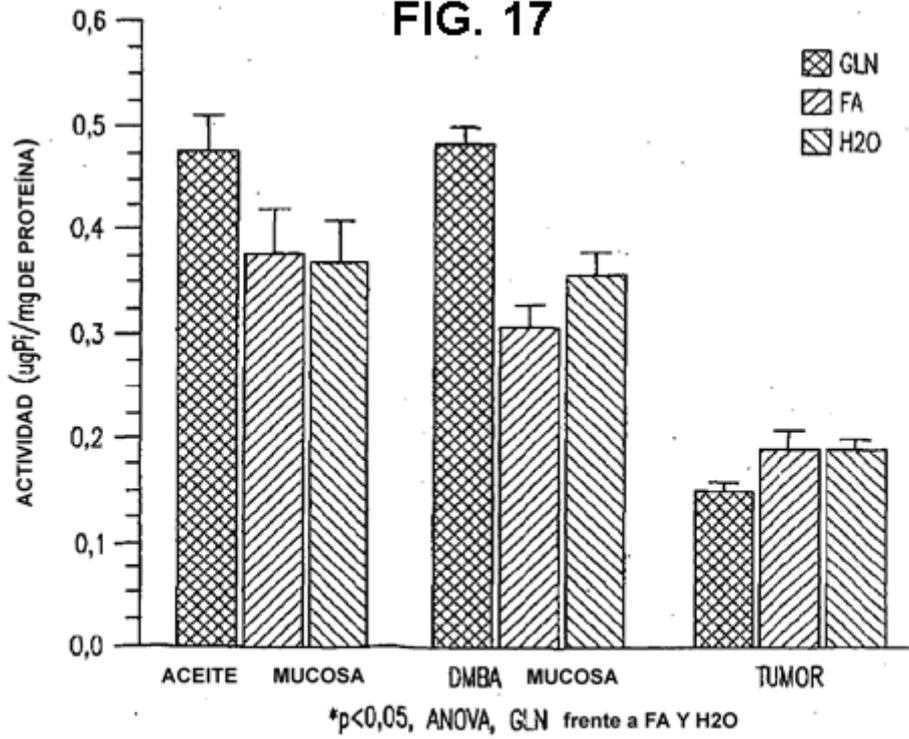
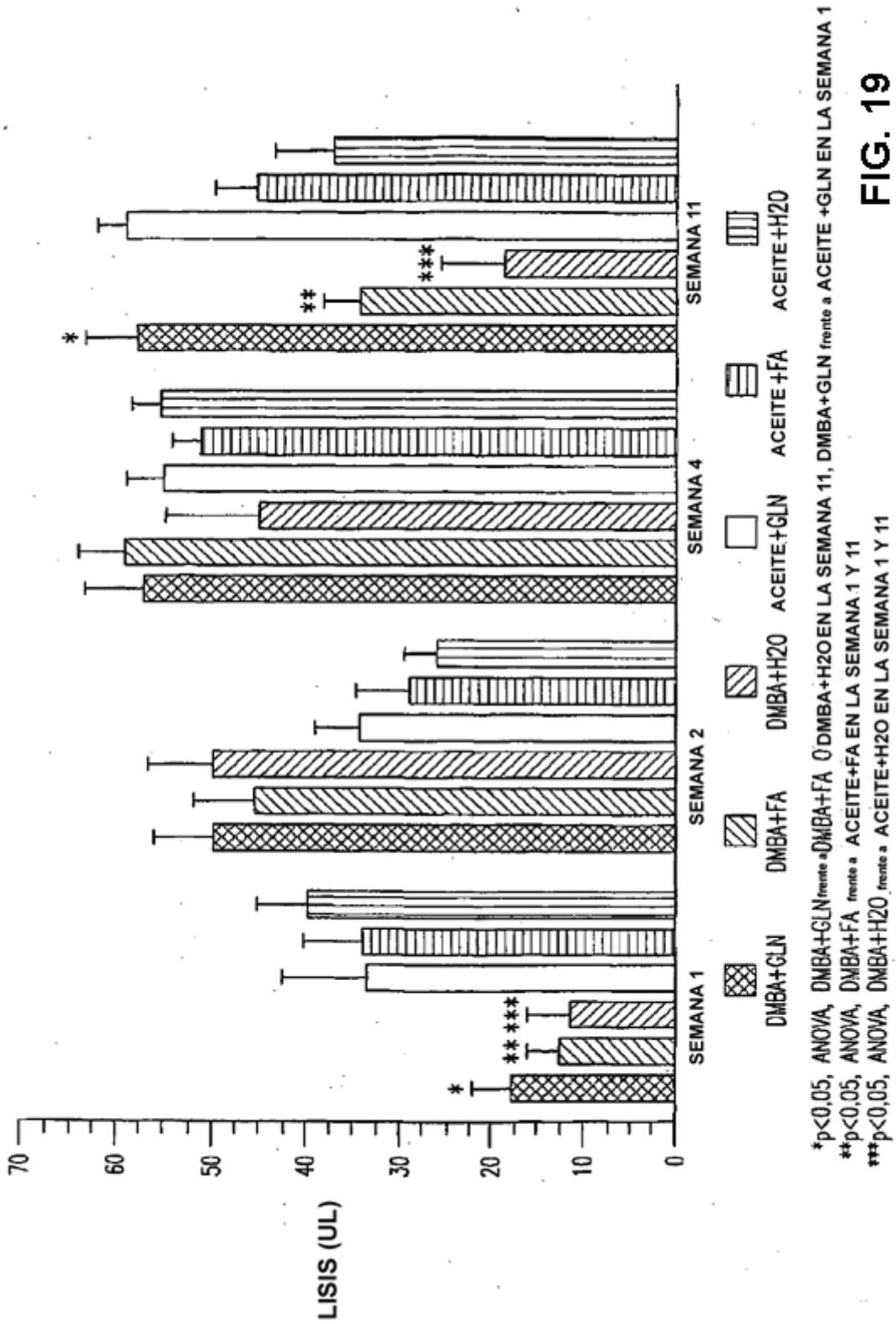


FIG. 18



**FIG. 19**