

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 370**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010** **E 10745670 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014** **EP 2446276**

54 Título: **Métodos para la determinación del estado oncogénico de una célula, sus aplicaciones, y métodos para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

25.06.2009 FR 0903101

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

25.11.2014

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris , FR y

AFFICHEM (50.0%)

72 Inventor/es:

DE MEDINA, PHILIPPE;

PAILLASSE, MICHAËL;

POIROT, MARC y

SILVENTE-POIROT, SANDRINE

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 523 370 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

Métodos para la determinación del estado oncogénico de una célula, sus aplicaciones, y métodos para el tratamiento del cáncer

5

Sector de la técnica

La invención concierne a métodos para la determinación del estado oncogénico de una célula y a sus aplicaciones. La invención concierne igualmente a inhibidores del OCDO para su utilización en métodos de tratamiento de cánceres.

10

Estado de la técnica

El diagnóstico de un cáncer se basa en diferentes elementos, tales como particularmente la auscultación y los exámenes médicos (endoscopia, fibroscopia, radioscopia, etc.), que permiten al médico constatar los signos visibles o palpables de la enfermedad, pero igualmente los análisis de sangre y de orina, que permiten conocer el número de glóbulos rojos, de glóbulos blancos y de plaquetas, el índice de hemoglobina, el índice de creatinina, o incluso la detección de la presencia de marcadores específicos del cáncer en muestras tomadas del paciente. En la bibliografía se han descrito numerosos marcadores del cáncer. Estos son generalmente específicos para ciertos tipos de cánceres en particular, incluso de subpoblaciones de pacientes. Por otro lado, los marcadores descritos en la bibliografía no permiten generalmente diagnosticar el cáncer de forma segura, y los índices de falsos negativos o de falsos positivos son todavía importantes. Finalmente, ciertos marcadores no son detectables más que en un estado tardío del desarrollo del cáncer, lo que compromete al menos en parte el éxito del tratamiento.

15

20

25

Existe por tanto una necesidad de nuevos marcadores del cáncer que permitan diagnosticar cualquier tipo de cáncer, y esto en un estado precoz y de forma segura y reproducible.

Azuma A et al. Photoaffinity labeling of tumor promoter-binding protein (CN-TPBP) and préparation of affinity sorbent gels. Biol Pharm Bull., enero de 1997; 20 (1): 6 - 9, es relativo a métodos de dosificación del OCDO.

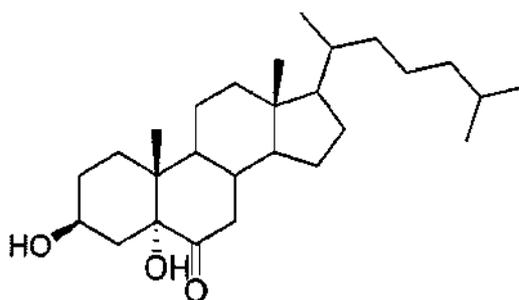
30

Matsushima Yet al. Enhancement of human papillomavirus type 18 gene expression in HeLa cells by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, 3 beta,5 alpha-dihydroxycolestan-6-one, and colesterol. Biol Pharm Bull., septiembre de 1994; 17 (9): 1292 - 5, es relativo al papel del OCDO como inductor del gen vírico HPV18.

35

Objeto de la invención

La invención concierne a un método para la detección del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida a partir de un sujeto, caracterizado porque comprende una etapa en el que se determina la cantidad del compuesto OCDO de fórmula



40

(6-oxo-colestan-3 β ,5 α -diol)

presente en las células recogidas.

45

La invención concierne igualmente a un método para el diagnóstico de un cáncer en un sujeto, caracterizado porque comprende una etapa de detección del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida a partir de un sujeto según el método de detección de la invención, en el que una cantidad de OCDO superior a un valor de referencia medido en las células de una muestra de un sujeto sano, es indicativa de un estado oncogénico de las células de dicha muestra.

50

La invención concierne también a la utilización del compuesto OCDO presente en las células de una muestra obtenida a partir de un sujeto, como marcador del estado oncogénico de dichas células.

55

La invención concierne igualmente a un método para el seguimiento de la respuesta a un tratamiento de un sujeto

que padece un cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de detección, antes y en el transcurso del tratamiento, del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida a partir de dicho sujeto según el método de detección de la invención; siendo un cambio en el estado oncogénico del sujeto en el transcurso del tratamiento indicativo de una respuesta del sujeto a dicho tratamiento.

5 La invención concierne igualmente a un método para la evaluación de la eficacia de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en un sujeto afectado por dicho cáncer, que comprende:

- 10 (a) una etapa de detección del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida a partir de un sujeto según el método de detección de la invención en la que se cuantifica la concentración D1 del OCDO en un extracto líquido de las células de una muestra obtenida a partir de dicho sujeto;
- (b) después de un tiempo de tratamiento terapéutico, una etapa de detección del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida a partir de un sujeto según el método de detección de la invención en la que se cuantifica la concentración D2 del OCDO en un extracto líquido de las células de una muestra obtenida a partir
- 15 de dicho sujeto de la misma forma que en la etapa (a);
- (c) una etapa de comparación entre D1 y D2; y
- (d) si $D2 < D1$, se deduce que el medicamento es eficaz para el tratamiento de dicho cáncer.

20 La invención tiene también por objeto un método para la evaluación de la eficacia de un tratamiento del cáncer en un sujeto afectado por dicho cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de detección, antes y en el transcurso del tratamiento, del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida a partir de dicho sujeto según el método de detección de la invención; siendo un cambio en el estado oncogénico o en el diagnóstico del sujeto en el transcurso del tratamiento, indicativo de la eficacia de dicho tratamiento para el tratamiento del cáncer.

25 La invención concierne también a los inhibidores del OCDO para una utilización en un método de tratamiento de un cáncer en el ser humano o en un animal, eligiéndose dicho inhibidor de entre los inhibidores de la actividad de hidrolasa de epóxido de colesterol (ChEH) elegidos de entre el grupo que consiste en el Ro 48-8071 y la ibogaína.

Definiciones

30 Se entiende por « material biológico » o « muestra » en el sentido de la invención, un tejido biológico, una preparación o un extracto procedente de tejido biológico, líquido o sólido; el material también puede ser una mezcla de al menos dos materiales tales como los definidos anteriormente. Dicha muestra o material biológico puede prepararse por tanto, particularmente, bien a partir de tejidos, de órganos, de heces o de líquidos biológicos de un

35 hombre o de un ser humano, o bien obtenerse a partir de cultivos celulares « *in vitro* »; dicha muestra o material biológico también puede ser sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido seminal o líquido ascítico. Típicamente, una muestra o material biológico según la invención es una biopsia de un tejido canceroso o sospechoso de ser canceroso.

40 Por « sujeto » en el sentido de la invención, se entiende un mamífero, un ser humano o un animal.

Por « estado oncogénico » de una célula se entiende un estado desdiferenciado en el que el programa de proliferación de la célula ha sido modificado de tal forma que ésta prolifera de forma no controlada, pudiendo conducir a la formación de tumores malignos, invasivos y/o metastásicos.

45 Los términos « tratamiento » y « tratar » se refieren a cualquier acto que tienda a mejorar el estado de salud de un sujeto, tal como la terapia, la prevención, la profilaxis o la ralentización de la enfermedad. En ciertos modos de realización, estos términos se refieren a la mejora o a la erradicación de una enfermedad o de los síntomas asociados a esta enfermedad. En otros modos de realización, estos términos se refieren a la disminución de la

50 progresión o de la malignidad de la enfermedad.

Por « cantidad terapéuticamente eficaz », se entiende una cantidad suficiente para tratar al sujeto.

55 Por « cáncer » se entiende cualquier tipo de enfermedad en la que ciertas células del cuerpo humano o animal se dividen de una forma incontrolada. Los cánceres se eligen típicamente de entre carcinomas, sarcomas y cánceres hematopoyéticos. Más particularmente, el cáncer según la invención es un cáncer de mama, un cáncer de pulmón, un melanoma, un cáncer de colon, un cáncer de recto, un cáncer de páncreas, un mieloma múltiple, una leucemia, un linfoma, un sarcoma de Kaposi, un cáncer de testículos, un cáncer de próstata, un cáncer de útero, un glioma, un neuroblastoma, un osteosarcoma, un carcinoma embrionario, un carcinoma medular del tiroides.

60 Descripción detallada de la invención

La presente invención es relativa a la identificación de un marcador, el OCDO, que aparece en las células tumorales de forma precoz y que presenta unas propiedades mitógenas y de estimulación de la intensidad tumoral. La invención se basa en la detección de este marcador y en su cuantificación en las muestras obtenidas a partir de los

65 sujetos sospechosos de estar afectados, o que están afectados, por un cáncer. La invención concierne además a

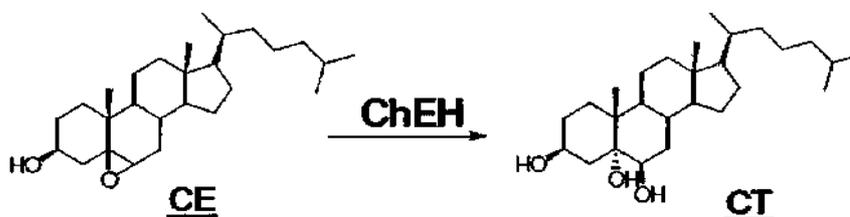
moléculas inhibitoras del OCDO para su utilización en métodos de tratamiento de cánceres.

El colesterol y los productos de oxidación del colesterol son sospechosos desde hace tiempo de presentar unas propiedades carcinógenas en el ser humano (Fritz Bischof, *Advances in Lipid Research*, vol 7, págs. 165 - 244, 1969). Estos efectos se han observado inicialmente en un número limitado de especies de roedores y han conducido a unas observaciones contradictorias que han implicado un desinterés por parte de la comunidad científica (Leland L Smith et al., *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 7, págs. 285 - 332, 1989). Ciertos productos de oxidación del colesterol son conocidos por aparecer durante el catabolismo del colesterol y en la producción de las hormonas esteroideas. Un cierto número de oxiesteroles juegan un papel fisiológico clave en el sistema inmunitario, el sistema nervioso y el sistema cardiovascular. Los objetivos conocidos de los oxiesteroles son los factores de transcripción dependientes de ligando, de los que los más conocidos son los receptores LXR (liver-X-receptor). Los oxiesteroles modulan el transporte intracelular del colesterol, la formación de microdominios lipídicos, la activación de las vías de HedgeHog implicadas en la morfogénesis durante el desarrollo embrionario; también tienen propiedades antagonistas de los receptores de los hidrocarburos aromáticos.

Se ha indicado que ciertos oxiesteroles modulan la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo del colesterol, y particularmente, en la biosíntesis de mevalonato (reductasa de HMG-CoA), en la esterificación del colesterol, en la hidrólisis de los epóxidos de colesterol (véase Schoepfer G. Jr.: *Physiological Reviews*, Vol. 80, N° 1, págs. 361 - 554, 2000). También se ha observado que, según la naturaleza del grupo oxigenado (alcohol, carbonilo, hidroperóxido, peróxido o epóxido), su posición en el esqueleto hidrocarbonado del colesterol, su orientación en el espacio y el número de grupos oxigenados en dicho esqueleto hidrocarbonado, un producto de oxidación del colesterol puede presentar unas propiedades de reconocimiento específicas de diferentes objetivos biológicos (membranas, enzimas, receptores).

Según la invención, se ha constatado que el colestano-3 β ,5 α -diol-6-ona (OCDO) estaba presente en diversas líneas tumorales de origen tisular. Se han caracterizado las propiedades de esta molécula en la mitogénesis tumoral e, *in vitro*, en la invasividad de las células y en tumores implantados en roedores. Además, se ha demostrado que esta molécula implica, en las células tumorales, una estimulación de la expresión de las citocinas inmunosupresoras mientras que disminuye la expresión de las citocinas inmunoestimulantes, lo que está de acuerdo con una inmunosupresión en las cercanías del tumor que favorece su desarrollo y su invasividad.

Se sabe que la hidrolasa de epóxido de colesterol (ChEH) es una enzima responsable de la hidrólisis del epóxido de colesterol (CE) en colestano triol (CT) según la siguiente reacción:



(véase de Médina et al, *Faseb J.* 19(4): A285 - A285, Parte 1 Supl. S, 04 de marzo de 2005).

En un primer momento, las solicitantes han comparado la actividad de la ChEH para los extractos celulares obtenidos a partir de células de tejidos normales y a partir de células tumorales: la actividad de la ChEH puede observarse separando mediante una cromatografía en capa fina, el sustrato CE con respecto al producto CT de la ChEH. La visualización de las manchas correspondientes a los compuestos CE y CT se ha realizado mediante un radiomarcado con ¹⁴C. El detalle del experimento se proporciona en el ensayo 1 se detalla más adelante, y el resultado está representado en la figura 1.

Las solicitantes han constatado que las células normales permiten visualizar dos manchas correspondientes a los compuestos CE y CT, pero que por el contrario, de forma sorprendente, las células tumorales hacían parecer tres manchas, a saber, una correspondiente al colestano triol (CT), la segunda correspondiente al epóxido de colesterol (CE) (débil con respecto a la mancha correspondiente relativa a las células normales), y una tercera mancha cercana a la del compuesto CE, pero sin embargo perfectamente distinta.

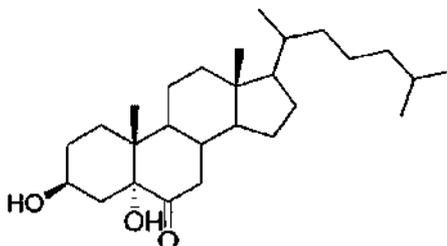
Se sabe que el tamoxifeno (tam), utilizado de forma conocida como agente antineoplásico reductor de los tumores para el tratamiento y la prevención de cánceres de mama, es un inhibidor de la ChEH y que sucede lo mismo para la PBPE (N,N-pirrolidin- [(4-bencil-fenoxi)-etanamina], que es un conocido agente antiproliferativo (véase a este respecto la referencia de la publicación proporcionada en el ensayo 2 de la presente solicitud). Ni esta « tercera mancha », que las solicitantes han atribuido a un metabolito M, ni la mancha del CT, existen si las células tumorales son tratadas con tamoxifeno. Sabiendo que el tamoxifeno inhibe la ChEH, se ha investigado, en un segundo

momento, si la inhibición de la ChEH podía ser el origen de la aparición de la « tercera mancha » en la placa de la cromatografía de las células tumorales tratadas. Los detalles de este experimento se proporcionan en el ensayo 2 descrito más adelante, y los resultados están representados en las figuras 3A y 3B. Para llevar esto a cabo se ha realizado, en extractos de células tumorales tratadas respectivamente con tamoxifeno o con PBPE, una inhibición de la actividad de la ChEH, la incubación de las células para mantener el inhibidor durante tres días, con unas cantidades crecientes de inhibidor para los ensayos sucesivos. Y se ha constatado, en las cromatografías en capa fina que, cuando la dosis de inhibidor aumenta, el compuesto CT se dispara al mismo tiempo que la « tercera mancha » vecina de la del compuesto CE. Según la invención, la solicitante ha deducido que el metabolito M relativo a la « tercera mancha » era probablemente un derivado del compuesto CT.

En un tercer momento, las solicitantes han completado este experimento estableciendo que la formación del metabolito M correspondiente a la « tercera mancha » se efectuaba progresivamente después de una incubación de más de 24 horas con el inhibidor de la ChEH tamoxifeno, en detrimento de la formación del compuesto CE; y este fenómeno se producía con los dos isómeros α y β del compuesto CE. Este complemento de la demostración está detallado en el ensayo 3 y representado en las figuras 2A y 2B. Las solicitantes han concluido por tanto, según la invención, que el producto relativo a la « tercera mancha », es un producto de transformación del compuesto CT, que tiene un comportamiento cromatográfico cercano al del compuesto CE pero que es retenido de forma más importante por el soporte de la cromatografía, lo que indica que el metabolito M asociado a la « tercera mancha » es un compuesto con una polaridad intermedia entre las de los compuestos CT y CE y con una estructura cercana a la de las dos moléculas de CE y de CT.

El ensayo 4 detallado más adelante, proporciona todos los detalles del estudio realizado para confirmar que el metabolito M de la « tercera mancha » proviene de una transformación del compuesto CT; el resultado de este ensayo está representado en la figura 4.

Finalmente, el ensayo 5 describe el método que ha permitido la identificación química del producto correspondiente a esta « tercera mancha ». Las solicitantes han establecido por lo tanto, según la invención, que esta « tercera mancha », que aparecía únicamente en las células tumorales ensayadas, es debida al 6-oxo-colestan-3 β ,5 α -diol (OCDO) correspondiente a la siguiente fórmula:



El producto OCDO no es un producto nuevo: ha sido descrito como un producto de la oxidación del colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) por la N-bromosuccinimida (Fieser L. F. y; Rajagopalan S.: Selective oxydation with N-bromosuccinimide. II. Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol, J Am Chem Soc, 71, págs. 3938 - 41, 1949). La síntesis química del OCDO ya había sido descrita en 1908 (Robert Howson Pickard et al., J. Chem. Soc. Trans. vol 93, págs. 1678 - 1687, 1908).

La existencia de esta molécula como metabolito procedente de la transformación del colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol ha sido notificada en 1971: se ha indicado que podía recogerse el OCDO en las heces de rata cebada con colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (Roscoe HG, Fahrenbach MJ, J Lipid Res, vol 12, págs. 17 - 23, 1971). También se ha indicado que el OCDO podía encontrarse en el suero bovino y en la sangre humana a una concentración comprendida entre 10 y 100 nM (Yamaguchi M. et al, Biol. Pharm. Bull. 20 (9), págs. 1044 - 46, 1997).

A continuación se va a proporcionar el procedimiento experimental detallado llevado a cabo para los ensayos 1 a 5, que han permitido conseguir la identificación del marcador OCDO.

Para los ensayos 1 a 5 y en algunos de los ejemplos proporcionados más adelante en esta solicitud de patente, se han utilizado células tumorales MCF7, procedentes de la American Tissue Culture Collection (ATCC). Estas células se cultivan en medio RPMI 1640 complementado con 2 g/litro de carbonato de sodio acuoso, 1,2 mM de glutamina (a pH 7,4 a 23 °C) y 5 % de suero bovino fetal (Gibco), a 37 °C bajo un 5 % de CO₂, y 2,5 ml de antibióticos (penicilina / estreptomina) por litro de medio. Se ha deseado estudiar la actividad de la ChEH en células de ratón mediante una cromatografía en capa fina de sílice. Los compuestos que se desean visualizar son los compuestos CE y CT definidos previamente. Con el fin de visualizar las manchas correspondientes al CE y al CT en una placa de cromatografía, se han sintetizado los compuestos CE y CT marcados con ¹⁴C.

a) Síntesis del 5,6- β epoxicolestan-3 β -ol [¹⁴C] y del 5,6- α epoxicolestan-3 β -ol [¹⁴C].

Se disuelven 0,35 μmol de colesterol [^{14}C] (58 mCi/mmol) en 200 μl de diclorometano en presencia de 0,56 μmol de ácido metacloroperbenzoico. La disolución se agita a la temperatura ambiente durante 5 horas. La mezcla de reacción se disuelve en 1 ml de diclorometano, se lava con sulfito de sodio acuoso (10 % en peso), hidrogenocarbonato de sodio (disolución acuosa al 5 % en peso) y una disolución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se evapora y el residuo se purifica mediante una RP-HPLC (columna hidrófoba Ultrasep ES C18 6 μm) en condición isocrática de $\text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$ (95 / 5 en volumen) a 0.7 ml/min. Los isómeros α y β son fácilmente separados en estas condiciones y detectados con un detector de radioactividad (Berthold).

El rendimiento total de la reacción es del 80 %; el producto obtenido contiene un 75 % del isómero α (CE α) y un 25 % del isómero β (CE β).

b) Síntesis del colestán 3 β ,5 α ,6 β triol [^{14}C]:

Este compuesto se ha sintetizado a partir del 5,6- β epoxicolestan-3 β -ol [^{14}C] como se describe en la bibliografía (Pulfer MK and Murphy RC, Formation of biologically active oxysterols during ozonolysis of cholesterol present in lung surfactant, J Biol Chem, vol. 279 (25) págs. 26331 - 26338, 2004). El CE β [^{14}C] preparado en a) más arriba (58 mCi/mmol) se disuelve en 1 ml de una mezcla de tetrahidrofurano / H_2O / acetona (v/v/v, 4:1:0.5). Se añaden 125 μl de ácido perclórico a la mezcla de reacción, que se agita durante 4 horas a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluye en 1 ml de diclorometano y después se lava con hidrogenocarbonato de sodio (disolución acuosa al 5 % en peso) y con agua. El residuo se purifica mediante una HPLC en columna hidrófoba (Ultrasep ES C18 6 μm) en condición isocrática de $\text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$ (95 / 5 en volumen) a un flujo de 0.7 ml/min. Se obtiene el CT [^{14}C] con un rendimiento del 62 %.

Para ser utilizadas en los siguientes ensayos 1 a 5, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 80.000 células en un volumen de 2 ml. Treinta y seis horas después de la siembra, las células se trataron durante 15 minutos bien con el disolvente de vehículo (etanol al 1 ‰ en un tampón de PBS), bien con los compuestos que se desea ensayar; esta incubación se realiza por tanto, según las necesidades del ensayo, con los compuestos CE α [^{14}C] (0.6 μM , 15 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) y CE β [^{14}C] (0,6 μM , 15 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) o CT [^{14}C] (1 μM , 15 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), la proporción de disolvente no supera el 2 ‰ con respecto al volumen del medio de cultivo. Después del tiempo de incubación que se desea para el ensayo, se recoge el medio, las células se lavan con PBS (tampón de fosfato) frío (2 ml por pocillo) agrupadas con el medio. Las células se raspan a continuación en PBS frío (1 ml para 3 pocillos); los pocillos se lavan de nuevo con PBS frío (1 ml para 3 pocillos). La suspensión celular obtenida se centrifuga a 1.000 t/min durante 5 min a 4 °C. El sedimento celular y el medio se extraen mediante el método de Folch modificado (tal como el publicado por Ways P. et al., J lipid Res, 5 (3): 318 (1964)). En toda la continuación de esta descripción, el disolvente de vehículo utilizado es el mismo que se ha definido anteriormente.

Se cuentan las radioactividades acuosa y orgánica. Las fases orgánicas se secan bajo argón. El residuo se resuspende en 60 μl de etanol y después se deposita, a razón de 20 μl por pista, sobre placas de sílice en vidrio (LK-6-DFW whatman de 20 x 20), que se utilizan en los diferentes ensayos (estas placas han sido previamente calentadas a 100 °C durante 1 hora). El disolvente de migración utilizado es acetato de etilo. Las placas de cromatografía se colocan en contacto con una placa « Phosphor-screen » en un casete durante una noche. La « Phosphor-screen » se revela con un « Phosphor Imager » de tipo Storm. Para evaluar el carácter más o menos denso de las manchas obtenidas en las placas, se cuantifica la radioactividad mediante densitometría con el programa informático « Imagequant » ($^{\text{TM}}$).

Ensayo 1

En este ensayo 1 se ha puesto en evidencia la actividad de la ChEH en células de ratón sanas y en células de ratón tumorales MCF7. Se procede mediante cromatografía en capa fina según las técnicas que acaban de ser expuestas. Los resultados están presentados en la figura 1.

En esta figura se aprecia que todos los depósitos han sido realizados al mismo nivel de referencia para un trazo mixto en la parte baja de las pistas.

En la pista izquierda se ha depositado el compuesto CE [^{14}C] preparado previamente como se ha indicado anteriormente (0,6 μM , 15 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). Las pistas intermedia y derecha se corresponden con los extractos de las células incubadas previamente en CE [^{14}C] según la técnica expuesta anteriormente.

El extracto celular depositado en la parte baja de la pista de la derecha es un extracto que se corresponde con hepatocitos normales extraídos de ratones adultos C57/B16 de 20 - 25 g (proporcionados por Charles Rivers). Los hepatocitos se han aislado mediante perfusión de colagenasa según el protocolo de Davis (Davis RA et al, J. Biol Chem, 1979, Vol. 254, N° 6, págs. 2010 - 2016) y puestos en cultivo en placas de Petri de 6 cm de diámetro recubiertas con colágeno, a una densidad de 2 millones de células por placa, en medio nutritivo « Dulbecco modified eagle médium » (DMEM) que contiene un 10 % de suero bovino fetal, insulina (0.5 U/ml) y antibióticos (50 unidades/ml) (una mezcla de penicilina y estreptomocina). Las placas se mantienen a 37 °C en una estufa de

incubación húmeda con un 5 % de CO₂. Después de la adherencia de las células, el medio nutritivo es sustituido por medio fresco después de haber efectuado un lavado de las células con tampón de PBS para eliminar los desechos celulares. Las células son utilizadas a partir del día siguiente para el ensayo.

5 En la pista de la derecha de la figura 1 se observa que el compuesto CT aparece el primero y que el compuesto CE se encuentra sustancialmente al nivel del que ha sido depositado directamente en la pista derecha. El compuesto CT formado procede necesariamente del compuesto CE transformado por la hidrolasa ChEH, ya que una y otra aparecen en la cromatografía, cuando inicialmente sólo se había depositado, y era susceptible de aparecer, el compuesto marcado CE.

10 Por el contrario, en la pista intermedia se han depositado los extractos de células de ratones tumorales MCF7; este extracto celular se ha preparado a partir de células MCF7 cultivadas de la misma forma que el extracto de hepatocitos a partir de células de ratón C57/B16. Se constata una mancha correspondiente al compuesto CT y después dos manchas, cercanas entre sí, correspondientes una al compuesto CE de la pista derecha, y la otra a un metabolito M no identificado; además, esta « tercera mancha » es más intensa que la correspondiente al compuesto CE.

15 Por lo tanto se ha deducido que, en las células tumorales, una parte del compuesto CE se había transformado en un metabolito M que tenía un comportamiento cromatográfico cercano al del compuesto CE y que tenía una polaridad intermedia entre las de los compuestos CE y CT.

Ensayo 2

25 Se ha investigado si la aparición de la « tercera mancha » en la placa de cromatografía del ensayo 1, se veía afectada o no por una inhibición de la ChEH, que, en la célula, da nacimiento al compuesto CT a partir del compuesto CE. Se sabe que la ChEH es inhibida por el tamoxifeno (Tam) y por la PBPE (FASEB Journal, Vol. 19, Issue 4, págs. A285 - A285, Parte 1 Supl. S). Para este ensayo se han utilizado por tanto estos dos inhibidores.

30 Para llevar esto a cabo se han depositado en una placa de cromatografía, del mismo tipo que la utilizada para el ensayo 1, los extractos celulares de las células de tumorales MCF7 incubadas en una disolución de CE (α ó β) [¹⁴C] como se ha indicado en el ensayo 1, y después, a continuación, incubadas en una disolución acuosa del inhibidor de la ChEH, el tamoxifeno o la PBPE, durante 3 días. Cuando se utiliza una incubación con CE α [¹⁴C], se aplican disoluciones de tamoxifeno a unas concentraciones de 1×10^{-2} , 1×10^{-1} , 5×10^{-1} , 1, 2,5 y 5 μ M (figura 3A); cuando se utiliza una incubación con el CE β [¹⁴C], las disoluciones de PBPE se aplican a unas concentraciones de 1×10^{-2} , 1×10^{-1} , 1, 5 y 10 μ M (figura 3B); las figuras 3A y 3B representan las placas cromatográficas obtenidas en los dos casos. Se constata que, para unas cantidades fuertes de inhibidor en la incubación, ha desaparecido el compuesto CT y, simultáneamente, ha desaparecido la « tercera mancha » debida al metabolito M; por el contrario, para unas cantidades bajas de inhibidor, la mancha del compuesto CT es importante, al igual que la mancha debida al metabolito M, mientras que las manchas debidas al CE son débiles, lo que demuestra que el CE ha sido transformado en (CT + metabolito); se ha concluido que la hidrolasa ChEH, cuando está poco inhibida, deja aparecer el CT y que, por lo tanto, la mancha del metabolito M aparecía igualmente.

Ensayo 3

45 Se ha estudiado la cinética de la actividad de la ChEH en células MCF7 utilizando el compuesto CE (α ó β) marcado con [¹⁴C]. Como en el ensayo 2, las células se incuban con CE (α ó β) [¹⁴C]. Los extractos se depositan en las placas de cromatografía después de unos tiempos de incubación de 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas: las placas obtenidas están representadas en las figuras 2A (para el CE α) y 2B (para el CE β). Los depósitos, como para las figuras 1 y 3A, 3B se han realizado al mismo nivel de referencia para un trazo mixto en la parte baja de las pistas. Para un plazo de incubación corto, se observa que el compuesto CE no tiene tiempo de ser muy transformado en el compuesto CT; pero si se aumenta tiempo de incubación, la ChEH transforma cada vez más el compuesto CE en el compuesto CT, de forma que las manchas de CT son más densas, mientras que las manchas de CE se hacen más claras; y simultáneamente, cuando aparece el compuesto CT, se ven aparecer las « terceras manchas » correspondientes a un metabolito M.

55 La solicitante ha considerado por tanto probable que el metabolito M de la « tercera mancha » fuera un derivado del compuesto CT.

Ensayo 4

60 Para verificar las conclusiones extraídas de los ejemplos 1 a 3, se han incubado las células MCF7 con el compuesto CT [¹⁴C] durante unos tiempos de 24, 48 y 15 72 horas utilizando los procedimientos definidos anteriormente. Los extractos celulares se han obtenido a continuación como se indicó en el ensayo 1 y se ha depositado en una placa de cromatografía (véase la figura 4). La pista de la izquierda de la placa recibe un depósito de CE [¹⁴C] y la pista vecina recibe un depósito de CT [¹⁴C], como control de la migración; las otras tres pistas corresponden a los extractos celulares ensayados después de la incubación. Se constata que, para una incubación con una duración de

24 horas, en la pista del extracto celular se observa una mancha correspondiente a la del metabolito vecino de la mancha del compuesto CE [^{14}C]. Esta mancha es tanto más densa cuanto mayor es el tiempo de incubación, y cuanto más oscura es la mancha del metabolito M, mas se aclara la del compuesto CT.

5 Esto confirma que el metabolito es efectivamente un producto de la transformación del compuesto CT.

Ensayo 5

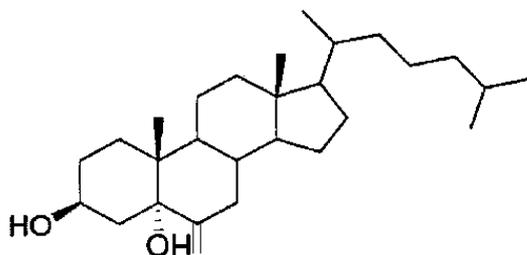
10 Para identificar la estructura química del metabolito aparecido en los ensayos 1 a 4, se ha utilizado una técnica en varias etapas. Se han sembrado las células MCF7 a $0,4 \times 10^6$ células por placa de Petri (diámetro de 100 mm) en 10 ml del medio definido en el ensayo 1. Treinta y seis horas después de la siembra, las células se han incubado a una concentración de $10 \mu\text{M}$, para las que estaban con CE α o para las otras con CE α [^{14}C] obtenido como se ha indicado previamente. Después de setenta y dos horas, las células se han lavado con PBS (tampón de fosfato) frío, y después se han raspado en PBS frío y se han centrifugado a 1.000 vueltas/min durante 5 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. El
15 sedimento celular y el medio se extraen mediante el método de Folch modificado (véase la referencia ya proporcionada en la página 9 del presente texto).

La fase orgánica se evapora, se resuspende en metanol y después se pasa por un cartucho RP C18 (Sep-Pack de la compañía Waters). El cartucho se lava a continuación con metanol. Después de la evaporación, el residuo se
20 disuelve en $20 \mu\text{l}$ de etanol y después se purifica mediante una HPLC en fase inversa (columna hidrófoba « Ultrasep ») utilizando las condiciones isocráticas: $\text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$ (95 / 5 en volumen) a $0,7 \text{ ml/min}$. Se recogen las fracciones de 1 min a la salida de la columna y se descuenta la radioactividad con el fin de determinar los tiempos de retención de los compuestos marcados, y particularmente el del metabolito surgido del CE α [^{14}C]. Las fracciones radioactivas son analizadas mediante una cromatografía en capa fina utilizando acetato de etilo como disolvente de migración.
25 Las fracciones de la HPLC de interés, procedentes de las células MCF7 tratadas con CE α frío, son analizadas mediante una espectrografía de masas de impacto electrónico (70 ev) y de ionización química (véase el espectro de la figura 5).

Así se ha determinado que el CT producido por las células MCF7 tiene una masa de 420 y un comportamiento
30 cromatográfico similar al del CT comercial. La espectrometría de masas del metabolito existente en los extractos de las células MCF7 y purificado como se ha indicado anteriormente, da una masa de 418, es decir, una pérdida de 2 unidades de masa con respecto al compuesto CT. Como se ha observado a partir de los ensayos 1 a 4, el metabolito procede de la biotransformación del compuesto CT: la diferencia de base se corresponde por tanto con una pérdida de 2 átomos de hidrógeno. Esto sugiere la aparición de una función cetona o la aparición de un doble
35 enlace en el compuesto CT. El análisis por infrarrojos muestra la aparición de una banda característica de una función cetona, lo que demuestra la formación del 6-oxo-colestan-3 β ,5 α -diol (OCDO). La estructura de compuesto OCDO se corresponde con un producto de la deshidrogenación del compuesto CT en el grupo hidroxilo del carbono 6 del núcleo. Las propiedades cromatográficas y el perfil de fragmentación de la espectrometría de masas del metabolito son idénticos a los del estándar comercial proporcionado por la compañía « Steraloïds » para el compuesto OCDO, lo que demuestra la identidad entre estas dos moléculas.
40

Métodos de diagnóstico del cáncer

45 La invención concierne por tanto a un método para la detección del estado oncogénico de las células obtenidas a partir de una muestra obtenida a partir de un sujeto, caracterizado porque comprende una etapa en la que se determina la cantidad del compuesto OCDO de fórmula



50 (6-oxo-colestan-3 β ,5 α -diol)

presente en les células obtenidas.

55 También se describe un método de diagnóstico para la detección del estado oncogénico de las células obtenidas a partir de un material biológico procedente de un sujeto humano o de un animal mamífero, caracterizado porque se determina mediante un medio revelador si las células obtenidas contienen, en una cantidad significativa, el

compuesto OCDO, y que, si esta determinación es positiva, se deduce que dichas células están en un estado oncogénico. La invención concierne igualmente a un método para el diagnóstico de un cáncer en un sujeto, que comprende una etapa de detección del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida a partir de un sujeto según el método de detección de la invención, en la que una cantidad del OCDO superior a un valor de referencia medido en las células de una muestra de un sujeto sano es indicativa de un estado oncogénico de las células de dicha muestra.

Según la invención, se compara la cantidad del OCDO en las células de la muestra del sujeto ensayado con un valor de referencia, siendo medido dicho valor de referencia en las células de una muestra de un sujeto en las mismas condiciones experimentales que para la medición de la cantidad del OCDO de las células de la muestra del sujeto ensayado. Una cantidad del OCDO significativamente mejorada con respecto al valor de referencia es, por lo tanto, indicativa de un estado oncogénico de las células de dicha muestra. Por « significativamente mejorada » se entiende un valor estadísticamente superior al valor de referencia ($p < 0,05$).

Los métodos según la invención permiten típicamente pronosticar la evolución de un tumor en un sujeto, y hacerlo en un estado precoz de la evolución de la enfermedad. Si las células de la muestra del sujeto presentan una cantidad del OCDO inferior o igual a un valor de referencia, esto es indicativo de un buen pronóstico y de un tumor benigno. Por el contrario, si las células de la muestra sujeto presentan una cantidad del OCDO superior a un valor de referencia, esto es indicativo de un mal pronóstico y de un tumor maligno.

Típicamente, la cantidad del OCDO se determina con la ayuda de un medio revelador.

En un modo de realización de la invención, la cantidad de compuesto OCDO se determina (se mide) en un extracto líquido de dichas células. Típicamente, este extracto líquido se obtiene lisando las células y separando después las fracciones sólida y líquida, por ejemplo, mediante una centrifugación. La fracción líquida constituye dicho « extracto líquido » de células.

Se puede detectar la presencia del OCDO en el extracto líquido mediante una cromatografía en capa fina, siendo por tanto la presencia del OCDO detectada en la placa de cromatografía mediante un medio revelador apropiado. Se puede prever que el medio revelador consiste en una modificación química del OCDO que permite que sea inmovilizado sobre una proteína de transporte, que se detecta posteriormente mediante anticuerpos monoclonales. Según una variante, el medio revelador es un marcador radioactivo de las células obtenidas realizado antes de la cromatografía, realizándose la revelación sobre la placa mediante una cuantificación de la radiactividad.

Se ha constatado que las células tienen un estado oncogénico cuando un extracto líquido de dichas células presenta una concentración del OCDO superior a $1 \mu\text{M}$. Se puede cuantificar la concentración del OCDO en el extracto mediante una cromatografía en fase líquida a alta presión (HPLC). También se puede cuantificar esta concentración mediante una cromatografía en fase gaseosa seguida de una espectrografía de masas.

En una forma de realización en particular, la cantidad del OCDO en el extracto líquido se determina mediante una cromatografía en capa fina, siendo detectado el compuesto OCDO sobre la placa de la cromatografía mediante un medio revelador apropiado.

También se describe una utilización del compuesto OCDO como marcador del estado oncogénico de una muestra obtenida a partir de un sujeto.

La invención concierne igualmente a una utilización del compuesto OCDO como marcador del estado oncogénico de un material biológico procedente de un sujeto humano o de un animal mamífero.

La invención concierne igualmente a una utilización del compuesto OCDO presente en las células de una muestra obtenida a partir de un sujeto como marcador del estado oncogénico de dichas células.

También se describe el compuesto OCDO para una utilización en un método de diagnóstico del cáncer llevada a cabo en el cuerpo humano o animal.

Métodos de seguimiento del tratamiento de un sujeto afectado por un cáncer

Igualmente se describe un método para el seguimiento de la respuesta a un tratamiento de un sujeto que padece un cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de determinar el diagnóstico del sujeto antes y en el transcurso del tratamiento utilizando el método de diagnóstico según la invención, siendo un cambio en el diagnóstico del sujeto en el transcurso del tratamiento indicativo de una respuesta del sujeto a dicho tratamiento.

La invención concierne también a un método para el seguimiento de la respuesta a un tratamiento de un sujeto que padece un cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de detectar, antes y en el transcurso del tratamiento, el estado oncogénico de las células de una muestra obtenida a partir de dicho sujeto según el método de detección de la invención; siendo un cambio en el estado oncogénico del sujeto en el transcurso del tratamiento indicativo de una

respuesta del sujeto a dicho tratamiento.

Según la invención, las tomas de muestras antes y en el transcurso del tratamiento son realizadas en las mismas condiciones experimentales.

5

Métodos de cribado de medicamentos antineoplásicos

La invención tiene igualmente por objeto un método para la evaluación de la eficacia de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto afectado por dicho cáncer, que comprende:

10

(a) una etapa de detección del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida a partir de un sujeto según el método de detección de la invención en la que se cuantifica la concentración D1 del OCDO en un extracto líquido de las células de una muestra obtenida a partir de dicho sujeto;

15

(b) después de un tiempo de tratamiento terapéutico, una etapa de detección del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida a partir de un sujeto según el método de detección de la invención en la que se cuantifica la concentración D2 del OCDO en un extracto líquido de las células de una muestra obtenida a partir de dicho sujeto de la misma forma que en la etapa (a);

(c) una etapa de comparación entre D1 y D2; y

20

(d) si $D2 < D1$, se deduce que el medicamento es eficaz para el tratamiento de dicho cáncer.

Igualmente se describe un método para la evaluación de la eficacia de un tratamiento del cáncer en un sujeto afectado por dicho cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de determinar el diagnóstico del sujeto antes y en el transcurso del tratamiento mediante la utilización del método de diagnóstico según la invención, siendo un cambio en el diagnóstico del sujeto en el transcurso del tratamiento indicativo de la eficacia de dicho tratamiento para el tratamiento del cáncer.

25

La invención concierne también a un método para la evaluación de la eficacia de un tratamiento del cáncer en un sujeto afectado por dicho cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de detectar, antes y en el transcurso del tratamiento, el estado oncogénico de las células de una muestra obtenida a partir de dicho sujeto según el método de detección de la invención; siendo un cambio en el estado oncogénico o en el diagnóstico del sujeto en el transcurso del tratamiento indicativo de la eficacia de dicho tratamiento para el tratamiento del cáncer.

30

Según la invención, las tomas de muestras antes y en el transcurso del tratamiento son realizadas en las mismas condiciones experimentales.

35

Métodos de tratamiento del cáncer

La invención tiene igualmente por objeto un inhibidor del OCDO para una utilización en un método de tratamiento de un cáncer en el ser humano o en un animal, caracterizado porque se elige de entre los inhibidores de la actividad hidrolasa de epóxido de colesterol (ChEH) elegidos de entre el grupo que consiste en el Ro 48-8071 y la ibogaína.

40

También se describe un método de tratamiento de un sujeto afectado por un cáncer, comprendiendo dicho método la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del OCDO.

45

Según un modo de realización, el OCDO se disuelve en etanol, la disolución obtenida se diluye entonces (típicamente al 1/1.000) en un tampón, particularmente un tampón de fosfato, y la disolución diluida así obtenida es inyectada al sujeto, típicamente intratumoralmente. Según el inhibidor utilizado, se pueden inyectar unas dosis diarias comprendidas entre 1 mg/kg y 500 mg/kg durante un tiempo comprendido entre 1 y 10 semanas. No obstante, el experto en la materia es apto para adaptar la forma en la que se administra el inhibidor del OCDO, al igual que la posología y la duración del tratamiento, según el paciente y la enfermedad tratada.

50

Se describe que el inhibidor del OCDO puede elegirse típicamente de entre los siguientes productos:

55

- los inhibidores de las enzimas implicadas en la biosíntesis del colesterol tales como la lovastatina, el inhibidor Ro 48-8071, el U18666A, el AY-9944, el triparanol, la terbinafina, el SKF-525A;

- los inhibidores de los citocromos P 450, las lipooxigenasas y los antioxidantes activos en la epoxidación del colesterol, tales como el ketoconazol y la vitamina E;

60

- los inhibidores de la actividad hidrolasa de epóxido de colesterol (ChEH) tales como la PBPE, la PCPE, el tesmilifeno, la dendrogenina A (DDA), el tamoxifeno, el 4 hidroxitamoxifeno el raloxifeno, el nitromifeno, el clomifeno, el RU 39411, el BD-1008, el haloperidol, el SR 31747A, la ibogaína, el AC-915, el rimcazol, la amiodarona, la trifluorperazina, el U18666A, el AY-9944, el triparanol, la terbinafina, el SKF-525A;

- los inhibidores elegidos del grupo formado por:

65

- los antagonistas de los receptores de estrógenos;
- los ligandos de los sitios de unión de membrana de los antiestrógenos (AEBS);
- los ligandos de los receptores σ 1 y 2 y ciertos aminoalquil esteroides

- los inhibidores del transporte intracelular del colesterol; y
- los inhibidores enzimáticos elegidos del grupo formado por la progesterona y los antagonistas de los receptores Ahr.

5 Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describen en las figuras y los ejemplos siguientes, que deben ser considerados como ilustrativos y como no limitantes del ámbito de la invención.

Descripción de las figuras

- 10 **Fig. 1:** medición de la actividad de la ChEH en las células MCF7 y en hepatocitos de ratón. Las células se incuban en presencia de CE [^{14}C] y después se extraen los lípidos y se analizan y se separan los esteroides mediante una cromatografía en capa fina sobre una placa de sílice. La placa de la cromatografía se revela mediante una autorradiografía. CE: epoxi-5,6-colestanol, CT: colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol, M: metabolito M.
- 15 **Fig. 2:** cinética de la actividad de la ChEH en las células MCF7. Las células MCF7 se incuban en presencia de CE α [^{14}C] (A) o de CE β [^{14}C] (B) durante unos tiempos crecientes de 4 a 72 horas. Los lípidos son extraídos de las células y los oxisteroides se analizan y se separan mediante una cromatografía en capa fina sobre una placa de sílice. La placa de la cromatografía se revela mediante una autorradiografía. CE: epoxi-5,6-colestanol, CT: colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol, M: metabolito M.
- 20 **Fig. 3:** inhibición dependiente de la dosis de la actividad de la ChEH (3 días) en las células MCF7 por el tamoxifeno y por la PBPE. Las células MCF7 se incuban en presencia de CE α [^{14}C] (A) o de CE β [^{14}C] (B) durante tres días en presencia de unas concentraciones crecientes de tamoxifeno (A) o de PBPE (B). Los lípidos se extraen de las células y se analizan los esteroides y se separan mediante una cromatografía en capa fina sobre una placa de sílice. La placa de la cromatografía se revela mediante una autorradiografía. CE: epoxi-5,6-colestanol, CT: colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol, M: metabolito M.
- 25 **Fig. 4:** transformación del CT en el metabolito M. Las células MCF7 se incuban en presencia de CT [^{14}C] (A) durante 24, 48 y 72 horas. Los lípidos se extraen de las células y se analizan y se separan los esteroides mediante una cromatografía en capa fina sobre una placa de sílice. La placa de la cromatografía se revela mediante una autorradiografía. CE: epoxi-5,6-colestanol, CT: colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol. M: metabolito M.
- 30 **Fig. 5:** espectro de masas del metabolito C. Las células MCF7 se incuban en presencia de CE, después los lípidos se extraen y se purifican mediante una HPLC y la fracción correspondiente al OCDO se analiza mediante una espectrometría de masas.
- 35 **Fig. 6:** análisis de la producción del OCDO en los tejidos sanos. Las células procedentes de diferentes órganos de ratón se incuban en presencia de CT [^{14}C] (A) durante 48 horas en presencia o en ausencia de tamoxifeno. Los lípidos se extraen de las células y se analizan y se separan los esteroides mediante una cromatografía en capa fina sobre una placa de sílice. La placa de la cromatografía se revela mediante una autorradiografía. CT: colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol. M: metabolito M.
- 40 **Fig. 7:** efecto del OCDO sobre la proliferación celular *in vitro*. Se cultivan células de un carcinoma medular de tiroides humano (células TT) en presencia de unas concentraciones crecientes del OCDO que varían entre 0,1 y 5 μM durante 4 días. Después de este tiempo de incubación, se mide la cantidad de células y se determina el factor de proliferación.
- 45 **Fig. 8:** efecto del OCDO sobre la progresión tumoral *in vivo*. Se implantan células TT en ratones lampiños. Los ratones se tratan bien con el disolvente de vehículo (disolvente) o bien con 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del OCDO mediante una inyección 1 vez al día 5 días de cada 7 durante varias semanas. Se mide el volumen del tumor y se indica en el gráfico en función del tiempo.
- 50 **Fig. 9:** análisis de los ganglios linfáticos. Se busca la presencia de células tumorales en los ganglios linfáticos y se compara entre los animales tratados con el disolvente de vehículo (disolvente) o con el OCDO.
- 55 **Fig. 10:** análisis histomorfológicos de los tumores. Los tumores de los animales tratados con el disolvente de vehículo (disolvente) o con el OCDO se fijan y se incuban en presencia anticuerpos dirigidos contra una citoqueratina, la calcitonina, y un antígeno de la membrana epitelial (EMA). El revelado se realiza con la ayuda de un complejo de estreptavina-biotina-peroxidasa seguido de una incubación con una disolución de diaminobencidina, y después se realiza una tinción con hematoxilina. La presencia de un color marrón es reveladora de la expresión de las proteínas marcadas por los anticuerpos.
- 60 **Fig. 11:** efecto del OCDO sobre la expresión de citocinas. Se tratan células THP1 *in vitro* con 10 μM del OCDO durante 4 horas. Se extraen los ARN totales de las células y se realiza la expresión de los genes que codifican para la IL12 y la IL10 y se indica en la figura.
- 65 **Fig. 12:** análisis del OCDO mediante una cromatografía líquida a alta presión (HPLC). Se separa el OCDO de los demás oxisteroides tales como el epoxi-5,6-colestanol (CE), el colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT) y el 7-cetocolesterol (7-ceto-Ch). Se utiliza una detección UV a 210 nm.
- Fig. 13:** curva de calibrado del OCDO mediante una HPLC. Se inyectan unas cantidades crecientes de desde 0,1 hasta 5 μg del OCDO y se analizan mediante una HPLC. El área de los picos correspondientes al OCDO se indica en función de la masa de producto inyectada. Se establece una recta de correlación a partir de la gráfica.
- Fig. 14:** análisis del OCDO mediante una cromatografía de gases (GC). Se trimitilsilila una mezcla de 5 α -colestano y del OCDO, y después se analiza mediante una cromatografía de gases acoplada a una espectrometría de masas (GC / MS). Se obtienen 3 picos. El primero (10,62 minutos) corresponde al 5 α -colestano, el segundo (32,43 minutos) corresponde al OCDO que ha perdido una molécula de H_2O (OCDO - H_2O), el tercero (36,68 minutos) corresponde al OCDO.

Fig. 15: análisis de la masa del pico que sale a los 32,43 minutos en la GC. El perfil de fragmentación de la masa hace aparecer un producto de deshidratación del OCDO (M^+ (472,3). Se representa la estructura del producto obtenido.

Fig. 16: análisis de la masa del pico que sale a los 36,68 minutos en la GC. El perfil de fragmentación de la masa hace aparecer un producto de deshidratación del OCDO (M^+ (-CH₃) 546). Se representa la estructura del producto obtenido.

Fig. 17: curva de calibrado del OCDO mediante una GC / MS. Se inyectan unas cantidades crecientes de desde 6,25 ng hasta 100 ng del OCDO y se analizan mediante una GC / MS. El área de los picos correspondientes al OCDO se indica en función de la masa de producto inyectada. Se establece una recta de correlación a partir de la gráfica.

Fig. 18: inhibición del crecimiento tumoral por parte del tamoxifeno *in vivo*. Se implantan células mamarias de tipo TS/A en ratones BALB/c. Los ratones se tratan con tamoxifeno (tamoxifeno) o con el disolvente de vehículo (vehículo). Se mide el volumen de los tumores con el transcurso del tiempo.

Fig. 19: análisis mediante una GC del contenido en OCDO de los tumores. Se extraen los tumores de los animales tratados o no con tamoxifeno. Los extractos se analizan mediante una GC / MS. El perfil de la GC de los extractos de los animales tratados con el disolvente de vehículo (A) revela la presencia de unos picos correspondientes al OCDO y a su producto de deshidratación (OCDO - H₂O).

Fig. 20: análisis mediante MS de los picos de las GC correspondientes al OCDO y al OCDO - H₂O. El análisis de la masa confirma la estructura de los compuestos presentes en los picos obtenidos en la GC.

Fig. 21: inhibición de la producción del OCDO en las células MCF7 por parte de los inhibidores de la ChEH. Las células MCF7 se incuban en presencia de CE α [¹⁴C] durante tres días en presencia del disolvente de vehículo (T), de epóxido de colesterol (CE), de tamoxifeno (Tam), de PBPE (PBPE), de raloxifeno (Ral), de tesmilifeno (DPPE). La pista marcada con CE α se corresponde con un depósito de CE α [¹⁴C] utilizado como patrón de migración. Los lípidos se extraen de las células y los esteroides se analizan y se separan mediante una cromatografía en capa fina sobre una placa de sílice. La placa de la cromatografía se revela mediante una autorradiografía. CE: epoxi-5,6-colestanol, CT: colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol.

Fig. 22: inhibición de la producción del OCDO en las células MCF7 por parte del ketoconazol, un inhibidor general del citocromo P450. Las células MCF7 se incuban en presencia de CE α [¹⁴C] durante tres días en presencia de disolvente de vehículo (control) o de 10 μ M de ketoconazol. Los lípidos se extraen de las células y los esteroides se analizan y se separan mediante una cromatografía en capa fina sobre una placa de sílice. La placa de la cromatografía se revela mediante una autorradiografía y se cuantifica la cantidad de CE y de OCDO.

Fig. 23: inhibición de la producción del OCDO en las células MCF7 por un aminoalquil esterol (DDA). La pista 1 se corresponde con un depósito de CE α [¹⁴C] utilizado como patrón de migración. La pista 2 se corresponde con un depósito de CT α [¹⁴C] utilizado como patrón de migración. Las células MCF7 se incuban en presencia de CE α [¹⁴C] durante 48 horas en presencia de disolvente de vehículo (pista 3), de 0.1 μ M de DDA (pista 4), de 1 μ M de DDA. Los lípidos se extraen de las células y los esteroides se analizan y se separan mediante una cromatografía en capa fina sobre una placa de sílice. La placa de la cromatografía se revela mediante una autorradiografía. CE: epoxi-5,6-colestanol, CT: colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol.

Fig. 24: inhibición de la producción del OCDO en las células MCF7 por parte de los moduladores del transporte intracelular del colesterol y de los moduladores de los receptores AhR: las células MCF7 se incuban en presencia de CT α [¹⁴C] durante 24 horas en presencia de disolvente de vehículo (pista 1), de progesterona (pista 2), de U18666A (pista 3), de TCDD (pista 4), de benzo(A)pireno (pista 5), de resveratrol (pista 6) y de PDM2 (pista 7). Los lípidos se extraen de las células y los esteroides se analizan y se separan mediante una cromatografía en capa fina sobre una placa de sílice. La placa de la cromatografía se revela mediante una autorradiografía. CT: colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol.

Ejemplo 1: el OCDO es un marcador del estado tumoral de una célula.

Mediante el método descrito en el ejemplo 4, a continuación, se ha ensayado la presencia del OCDO en numerosas líneas celulares tumorales con el fin de establecer que este marcador es observable en diferentes tipos celulares en el ser humano, en la rata o en el ratón. Se ha detectado la producción del OCDO en cada una de las líneas celulares tumorales ensayadas, como se indica en la siguiente tabla:

Línea celular	Tipo	Producción de OCDO
MCF7	Carcinoma de mama humano	+
MCF7 / TamR	Carcinoma de mama humano resistente al tamoxifeno	+
MDA-MB-231	Carcinoma de mama humano	+
TS / A	Carcinoma de mama murino	+
A-549	Carcinoma de pulmón humano	+
B16-F10	Melanoma murino	+
SK-MEL-28	Melanoma humano	+
U-937	Leucemia mieloide humana	+
J 774	Leucemia mieloide murina	+

Línea celular	Tipo	Producción de OCDO
THP.1	Leucemia monocítica aguda humana	+
HT-29	Carcinoma de colon humano	+
HeLa	Carcinoma de útero humano	+
C6	Glioma de rata	+
SK-N-SH	Neuroblastoma humano	+
Saos-2	Osteosarcoma humano	+
P19	Carcinoma embrionario murino	+
TT	Carcinoma medular de tiroides humano	+

Las solicitantes, habiendo constatado que el OCDO se encuentra en todas las células tumorales ensayadas, han concluido que el OCDO constituye un marcador del estado tumoral de las células.

- 5 No obstante, previamente, y de forma análoga a lo que se ha realizado en los ensayos 1 a 5 precedentes, se ha evaluado la transformación del compuesto CE en células de diferentes tejidos sanos de ratones en unas condiciones que permiten la detección del OCDO (véase el resultado en la figura 6). Se han incubado dichas células con el compuesto CE α [^{14}C] y se han observado mediante una cromatografía en capa fina de sílice las manchas radioactivas que aparecen con (+) o sin (-) una incubación con tamoxifeno. Se constata que si hay presente
- 10 tamoxifeno, el compuesto CT ya no aparece, lo que se corresponde claramente con una inhibición de la ChEH; en ausencia de una incubación con tamoxifeno, el compuesto CT aparece, pero no se aprecia ninguna presencia, en las cercanías del compuesto CE, de la mancha correspondiente a la presencia del OCDO.

15 Por lo tanto, está claro que el OCDO no es un producto de los tejidos normales; su detección constituye por tanto un buen elemento predictivo del estado tumoral de las células; el OCDO es un marcador del estado oncogénico de una célula.

Ejemplo 2: el OCDO es carcinógeno

- 20 A partir de los ensayos descritos previamente y del ejemplo 1, las solicitantes han pensado, según la invención, que la presencia del OCDO en las células en situación tumoral, podía estar relacionada con el hecho de que esta molécula podría tener, por sí misma, un potencial carcinógeno.

25 Dicho potencial no ha sido nunca notificado previamente en la bibliografía.

El colesterol no tiene propiedades mutágenas. Los precursores del OCDO y los epímeros de epóxidos de colesterol se han señalado como mutágenos débiles en células de mamíferos (Peterson AR, Peterson H, Spears CP, Trosko JE and Sevanian, Mutation Research, vol 203 págs. 355 - 366, 1988). Los epóxidos de esterol no han demostrado propiedades mutágenas en la prueba de Ames realizada en bacterias (Smith LL et al., Mutation Research, vol 68 págs. 23 - 30, 5 1979; Ansari GAS et al., Vol 20, págs. 35 - 41, 1982). Estas observaciones han sido confirmadas recientemente (Cheng YW et al., Food and Chemical Toxicology, vol 43, págs. 617 - 622, 2005). Ciertamente, se han encontrado homologías estructurales del OCDO con promotores tumorales tales como el TPA (13-acetato de 12-tetradecanoilforbol) (Endo Y. et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokio), vol 42 (3) págs. 462 - 469, 1994). Pero nadie ha descrito ni sugerido que el OCDO podría tener unas propiedades de activación de las PKC, ni de promoción de los

35 tumores en el animal de laboratorio; únicamente se ha demostrado que esta molécula se fijaba a una proteína de fijación de los ésteres de forbol (Endo Y., Biochem. Biophys. Res. Comm., vol 194, págs. 1529 - 1535, 1993).

En el ámbito celular, solamente se ha indicado que parece que el OCDO:

- 40 - 1) inhibe la formación de una roseta en linfocitos T procedentes de suero humano (Streuli R.A. et al., J. Immunol., Vol. 123 (6) n, págs. 2897 - 2902);
- 2) inhibe la movilidad de los leucocitos (Gordon L, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 77(7), págs. 4313 - 4316, 1980);
- 45 - 3) inhibe la toxicidad de las células NK en el ratón (Kucuk O. et al., Cell. Immunol., 139, págs. 541 - 549, 1992);
- 4) inhibe la actividad citolítica producida por los linfocitos T en el ratón (Kucuk O et al., Lipids, Vol. 29 (9), págs. 657 - 660, 1994), observándose estos efectos a unas concentraciones comprendidas entre 1 y 20 μM .

Mediante el presente ejemplo 2, las solicitantes han establecido, en el ámbito de la presente invención, que el OCDO tiene unos efectos sobre el desarrollo tumoral que no habían sido sugeridos nunca al experto en la técnica

50 por el estado de la técnica.

a) En este ejemplo 2, se ha utilizado la línea celular humana TT de carcinoma medular de tiroides (American Tissues and Cells Collection). Esta línea se ha cultivado en un medio F12K modificado por Kaighn (vendido por la compañía « Invitrogen »), que contiene un 10 % en peso de suero bovino fetal y 2,5 ml de una disolución de

antibióticos (penicilina / estreptomina) a 50 UI/g. El OCDO ensayado procede de la compañía « Steraloids ». Para estudiar *in vitro* efecto del OCDO sobre el crecimiento celular, se siembran las células TT en placas de seis pocillos (200.000 células por pocillo) en un medio F12K tal como el definido anteriormente. Las células TT se tratan cada dos días bien con disolvente (etanol al 0,1 % en tampón de fosfato PBS) o bien con unas cantidades del OCDO en el disolvente que conducen a unas concentraciones de 0,1; de 1; de 2,5; o de 5 µM. Las células se cuentan 4 días después de la siembra. Como se observa en la figura 7, la proliferación de las células TT está aumentada de una forma dependiente de la concentración por el tratamiento con el OCDO, cuando se compara, como referencia, con la proliferación de las células tratadas con el disolvente. A la concentración de 5 µM de OCDO, se mide un factor de inducción de la proliferación de 1,5 después de 4 días de tratamiento; la inducción de la proliferación se establece por tanto *in vitro* para las concentraciones del OCDO comprendidas entre 100 nM y 5 µM. El factor de estimulación de la proliferación es comparable al de los estrógenos, que son moléculas con propiedades mitógenas sobre las células tumorales de mama (véase: de Medina et al., J Pharmacol Exp Ther, vol. 319, 2006: págs. 139 - 149;

b) Las solicitantes han estudiado igualmente *in vivo* el efecto del OCDO sobre el desarrollo tumoral. Para la inyección en un animal, las células TT definidas previamente en este ejemplo en a) se recuperan con tripsina, se lavan dos veces y se suspenden en un tampón de fosfato PBS. Las células TT (aproximadamente 4×10^6 células / 0,1 ml) se inyectan a continuación por vía subcutánea en el flanco de ratones hembra « nude nu/nu Swiss » de 6 semanas (proporcionados por Charles River). Los animales se tratan por vía subcutánea una vez al día, 5 días de cada 7, bien con el OCDO a la dosis de 50 µg/kg (grupo tratado) o bien con el disolvente (grupo de control) durante un periodo de 110 días (el disolvente utilizado es etanol al 0,1 % en tampón de fosfato (PBS)). Los animales (5 ó 10 ratones por grupo) se vigilan regularmente para medir el desarrollo de los tumores. El volumen de los tumores se calcula según la fórmula $L \times L^2 \times 0,5$ en la que L es la longitud y 1 es la anchura del tumor. La figura 8 representa el volumen V de los tumores en función del tiempo de tratamiento t. El tratamiento con el OCDO acelera significativamente el crecimiento del tumor; el volumen del tumor en los animales tratados con el OCDO es casi tres veces más importante que en los animales de control tratados con el disolvente.

Se sacrificaron los animales después de 75 días de tratamiento y se extrajo el tumor, así como los diferentes órganos, para un análisis histológico. Se observó una invasión de los ganglios linfáticos (GL) en los animales tratados con el OCDO dos veces superior a la de los animales tratados con el disolvente (véase la figura 9).

Se ha realizado un análisis histomorfológico. Para llevarlo a cabo se extraen los tumores de los ratones tratados con el OCDO o con el disolvente, así como los diferentes órganos (ganglios linfáticos, pulmón e hígado), se fijan en un 10 % de formalina neutra tamponada y se incluyen en bloques de parafina. Para estos análisis los cortes se marcan con hematoxilina y eosina. El inmunomarcaje se realiza con anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos humanos asociados a los carcinomas medulares de tiroides. Los anticuerpos utilizados son anticuerpos policlonales anti-calcitonina (Dako SAS, Trappes, Francia, 1:1.000), el anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina (Dako clone AE1/AE3, 1:50) y el anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membranas epiteliales (EMA) (Dako clone E29, 1:50). El inmunomarcaje de los cortes de parafina está precedido por una técnica de recuperación de antígenos mediante calentamiento en un tampón de citrato (10 mM, pH 6) bien 15 dos veces durante 10 minutos en un horno microondas (750 W) para el anticuerpo anti-CEA, bien en un baño de agua a 95 °C durante 40 minutos para los anticuerpos anti-calcitonina y anti-EMA.

Después de la incubación con los anticuerpos definidos anteriormente, los cortes son inmunomarcados con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (StreptABComplex/HRP,Dako) seguido por una disolución cromógena de diaminobenzidina (DAB), después se tiñeron con hematoxilina.

Los controles negativos se realizan mediante la incubación en una disolución tampón que no contiene el anticuerpo primario. Los resultados obtenidos de este análisis histológico están representados en la figura 10 para cada uno de los tres anticuerpos utilizados. Se constata que los tumores procedentes de los animales tratados con el OCDO son claramente carcinomas medulares de tiroides humanos, lo que confirma la invasión de los ganglios linfáticos por parte de las células procedentes del tumor.

Las solicitantes han establecido por tanto que el OCDO tiene una actividad mitógena *in vivo* estimulando el crecimiento del tumor implantado en el animal de laboratorio.

Ejemplo 3: el OCDO estimula la IL10 y reduce la IL12, lo que explica su acción carcinógena. Las solicitantes, habiendo establecido, según la invención, que el OCDO estimula la capacidad invasión de las células cancerosas *in vivo*, han confirmado este efecto del OCDO estudiando *in vitro* la expresión de las citocinas en células THP1 tratadas *in vitro* con el OCDO.

Se cultivan células THP1 (línea celular mielóide humana proporcionada por la ATCC) en un medio de cultivo de tipo DMEM (Dubelco modified eagle medium) completado con un 10 % de suero bovino fetal y una mezcla de antibióticos. Las células THP1 se tratan con 10 µM del OCDO durante 4 horas. Los ARN se extraen según un procedimiento clásico. Se producen los ADN complementarios, utilizados después para medir la expresión de los genes de interés. Se ha estudiado la expresión de los genes que codifican para la interleucina 12 (IL12) y para la interleucina 10 (IL10), que representan una pareja de citocinas con propiedades antagonistas. La IL12 es una

citocina inmunoestimulante, mientras que la IL10 es una citocina inmunosupresora. La proporción de expresión de estas dos citocinas permite evaluar el potencial inmunosupresor o inmunoestimulante de la célula y su capacidad para favorecer la progresión tumoral, o por el contrario, de ralentizarla.

5 Los cebadores utilizados se corresponden con las secuencias humanas de la IL10 y de la IL12, y son los siguientes:

IL10 sentido: AAA-CCA-AAC-CAC-AAG-ACA-GAC (ID. SEC. Nº: 1),

IL10 antisentido: GCT-GAA-GGC-ATC-TCG-GAG (ID. SEC. Nº: 2),

IL12 sentido: CTA-TGG-TGA-GCC-GTG-ATT-GTG (ID. SEC. Nº: 3),

10 IL12 antisentido: TCT-GTG-TCA-TCC-TCC-TGT-GTC (ID. SEC. Nº: 4).

Los resultados están representados en la figura 11: el OCDO estimula la expresión de la citocina inmunosupresora IL10 y reduce la expresión de la citocina IL12. Este mecanismo permite explicar la estimulación por parte del OCDO de la capacidad de invasión de las células tumorales constatada con el ejemplo 2.

15

Ejemplo 4: cuantificación del OCDO

A) Cuantificación mediante HPLC

20 Se ha separado y cuantificado el OCDO mediante un método de cromatografía líquida a alta presión HPLC (95 de MeOH / 5 de H₂O; 0,7 ml/min; columna Ultrasep ES 6 µM de 250 x 4, C18 (Bishoff, Leonberg, Alemania)). El cromatógrafo es un aparato de la compañía Perkin Elmer; comprende una bomba de la serie 200 y un detector de redes de diodos de tipo 200.

25 El aparato está equipado con un ordenador « PC », que implementa el programa Turbochrome ^(TM) que permite el control de los aparatos y el tratamiento de los datos.

30 Se realiza un extracto celular de células tumorales MCF7 cultivadas como se ha indicado en el ensayo 1: se lisan aproximadamente 60 millones de células para obtener 25 µl de un extracto líquido después de una centrifugación de 10 min a 1.200 t/min. Se pasan 20 µl de este extracto por la columna de cromatografía.

El cromatograma resultante está indicado en la figura 12: se observa que el OCDO está separado del CT, del CE y del ceto-colesterol (7-Ceto-Ch). El tiempo de retención del OCDO es de 19 min.

35 Se realiza un calibrado para unir la medición de la superficie del pico OCDO así obtenido y el peso del OCDO contenido en la muestra.

40 Este calibrado se realiza con la ayuda de disoluciones etanólicas del OCDO vendidas por la compañía « Steraloids », con unas concentraciones crecientes. Se utiliza un volumen fijo de 20 µl de muestra. Se han inyectado las siguientes cantidades del OCDO: 80 ng, 0,4 µg, 0,8 µg, 4 µg y 8 µg. El área de los picos correspondientes al OCDO se ha medido mediante integración con la ayuda del programa informático Turbochrome ^(TM); estos valores (y) se han llevado a la gráfica de la figura 13 en función de las masas del OCDO (x) correspondientes. Se obtiene una recta de correlación adecuada ($y = 69430 x + 1381$; $r^2 = 0.999$; $n = 6 \times 3$; $p < 0,0001$; x en µg del OCDO; y en µV.s) que permite cuantificar el OCDO para las masas comprendidas entre 40 ng a 80 µg. Este método permite cuantificar el OCDO para unas cantidades comprendidas entre 0,1 y 5 µg de moléculas.

B) Cuantificación mediante cromatografía en fase gaseosa acoplada a una espectrografía de masas (GC / MS)

50 Se trimetilsilila una mezcla de 5α-colestano y de OCDO según el método descrito por Kedjouar (véase Ked- jouar et al, J Biol Chem, 2004, vol 279 n° 32, págs. 34048 - 61). La muestra se trata con 20 de una mezcla de N,Obis(trimetilsilil) trifluoroacétamida / piridina (50:50, v/v) durante 30 min a una temperatura de 60 °C. Los reactivos se evaporan bajo una corriente de nitrógeno y los derivados trimetilsililados (TMS) se disuelven en hexano. Estos análisis de GC / MS se realizan con un aparato de tipo 4890 « Sistema Hewlett Packard » equipado con una columna capilar de sílice RTX-50 (de 30 m x 0.32 mm de diámetro interno, espesor de la película de 0.1 µm; Restek). La temperatura del horno se ha programado a 230 °C durante 1 minuto, seguida de 230 a 240 °C a una velocidad de aumento de 1° por minuto durante 10 minutos, de 240 °C a 250 °C a una velocidad de aumento de 3° por minuto, continuada hasta 290 °C a una velocidad de aumento de 45 °C/min y después a 330 °C en 1 minuto.

60 El inyector y el detector estaban a 310 °C y a 340 °C respectivamente. El perfil de GC obtenido está representado en la figura 14. Se obtienen tres picos. El primero corresponde al 5α-colestano, que tiene un tiempo de retención de 10,62 minutos. El segundo tiene un tiempo de retención de 32,43 minutos y proporciona, en un análisis por espectrometría de masas con fragmentación por impacto electrónico, un resultado que corresponde a un producto de deshidratación del OCDO (M+ (472.3), M+ menos un grupo CH₃ y M+ menos 2 grupos de CH₃ (véase la figura 15). Finalmente, el último pico (tiempo de retención de 36,68 minutos) corresponde al OCDO y su perfil de fragmentación en masa se proporciona en la figura 16. Esta perfil determina las masas de 546.2 (M+ menos un CH₃), de 531.2 (M+ menos dos CH₃), de 472,2 (M+ menos H₂O y menos un grupo OTMS).

65

El calibrado del método se realiza con la ayuda de disoluciones etanólicas del OCDO de concentraciones crecientes. Se han inyectado las siguientes cantidades del OCDO: 6.25 ng, 12.5 ng, 50 ng y 100 ng. La integración del área de los picos correspondientes al OCDO para estas diferentes cantidades del OCDO han permitido establecer una curva de calibrado que permite cuantificar el OCDO. Esto método permite cuantificar las cantidades del OCDO comprendidas entre 5 y 200 ng (véase la figura 17).

Ejemplo 5: inhibición de la producción del OCDO por el tamoxifeno *in vivo*.

Ya se ha demostrado en el ensayo 2 (figura 3A) que la adición de tamoxifeno a los cultivos de las células tumorales MCF7 bloquea la producción del OCDO en estas células. A continuación se va a demostrar que el tamoxifeno administrado *in vivo* también implica una inhibición de la producción del OCDO.

Se han utilizado las técnicas de cuantificación detalladas en el ejemplo 4 para medir la modulación del OCDO sobre los tumores implantados en el ratón.

Inicialmente se realiza un cultivo celular de células TS/A. Estas células TS/A son adenocarcinomas de mama de ratón (véase Nanni P et al., Clin. Exp. Metastasis, oct-dic de 1983; 1 (4): 373 - 80). Las células se cultivan a 37 °C bajo un 5 % de CO₂, en un medio DMEM complementado con 2 g/litro de carbonato de sodio, 1,2 mM de glutamina (pH 7,4 a 23 °C), 5 % de suero bovino fetal (Gibco) y 2,5 ml de antibióticos por litro de medio (penicilina / estreptomina).

Las células TS/A se recuperan con tripsina, se lavan dos veces y se suspenden en tampón de PBS. Las células TS/A (aproximadamente 4×10^6 15 células / 0.1 ml) se inyectan a continuación por vía subcutánea en el flanco de ratones hembra BALB/c de 6 semanas (proporcionados por Charles River). Los animales se tratan 27 días después de la implantación de los tumores, por vía intratumoral una vez al día durante 37 días, bien con tamoxifeno a una concentración de 10 µM para unos volúmenes de inyección de 100 µl (grupo tratado con tamoxifeno) o bien con el disolvente de vehículo (etanol al 0,1 % en tampón de fosfato PBS (grupo de control). Los animales (10 ratones por grupo) son controlados regularmente para comprobar el desarrollo de los tumores. El volumen de los tumores se calcula según la siguiente fórmula $L \times l^2 \times 0.5$ (L es la longitud y l es el ancho del tumor). El experimento se ha reproducido dos veces. Los resultados se proporcionan en la figura 18 (la flecha indica el inicio del tratamiento).

Se observa por tanto cualitativamente, en la figura 18, una inhibición del crecimiento tumoral en los ratones tratados con tamoxifeno.

Para obtener una información cuantitativa sobre la inhibición del OCDO, el experimento se ha reproducido en las mismas condiciones, y los tumores se han extraído el día 28. Se añaden 5 volúmenes (con respecto a la masa extraída) de tampón (Tris-HCl 50 mM, KCl 150 mM, pH = 7,4). Los tumores se trituran y los homogeneizados se centrifugan durante 5 minutos a 2.500 vueltas/min a 4 °C. Se recuperan los sobrenadantes y después se añade 1 volumen de metanol (con respecto al volumen de sobrenadante) y 2 volúmenes de cloroformo. Después de la centrifugación (para separar las fases), se recupera la fase orgánica. La fase orgánica se evapora a sequedad, y después el residuo se recoge con 0.5 ml de cloroformo. Los extractos orgánicos se filtran a través de cartuchos de sílice de 0.5 ml. Los esteroides polares eluyen de forma secuencial con:

- 1) 0.5 ml de una mezcla de hexano / cloroformo (1/1)
- 2) 0.5 ml de cloroformo,
- 3) 0.5 ml de acetato de etilo y metanol.

La adición de un patrón externo de OCDO marcado con ¹⁴C durante las fases de extracción y de purificación permite establecer un rendimiento de recuperación del 86 ± 6 %. Las fracciones de acetato de etilo se evaporan, se silitan (50 µl de acetonitrilo 1/ de BSTFA 1) y después se analiza mediante GC / MS (2 µl) según las condiciones descritas previamente.

La figura 19 presenta dos cromatogramas realizados en fase gaseosa como se ha indicado en el ejemplo 4, que se corresponden con:

- A) un extracto de un tumor procedente de un animal de control: el tumor tenía una masa de 2 g;
- B) un extracto de un tumor procedente de un animal tratado con tamoxifeno: el tumor tenía una masa de 1,45 g.

Se observa en la figura 19 una disminución significativa de los picos correspondientes al OCDO en el tumor de los ratones tratados (B) en comparación con el de los ratones no tratados (A). El análisis mediante una espectrometría de masas confirma la estructura de las moléculas en los picos de interés (véase la figura 20).

A continuación se proporcionan las cifras de los resultados así obtenidos, habiendo sido el grupo de control definido previamente, y se ha valorado en 100 los valores asociados al control con unos coeficientes que se han aplicado igualmente a los resultados relativos al tamoxifeno.

Molécula	Día 28		Día 37	
	Tamaño del tumor (% del control)	OCDO (% del control)	Tamaño del tumor (% del control)	OCDO (% del control)
Control no tratado	100	100	100	100
Tamoxifeno	73,5 ± 8	19,2 ± 4	46,2 ± 7	8,4 ± 4

Se observa que, *in vivo*, el tamoxifeno inhibe significativamente el OCDO.

- 5 El hecho de que el tamoxifeno ejerza una actividad antitumoral inhibiendo *in vivo* la producción de un oxiesterol promotor de los tumores demuestra que el OCDO juega un papel en los efectos del tamoxifeno.

Ejemplo 6: inhibición de la producción del OCDO por la PBPE *in vivo*.

- 10 La PBPE es un compuesto cuyo efecto antiproliferativo ha sido establecido mediante experimentos *in vitro* (véase la referencia citada en el ensayo 2 y también la publicación Payre B. et al, Mol. Cancer Ther., 7 (12), 3707 - 3717). Se han determinado, para la PBPE, unos resultados *in vivo* análogos a los presentados en el ejemplo 5 para el tamoxifeno. El protocolo utilizado es estrictamente idéntico al que se ha detallado en el ejemplo 5 para el tratamiento con tamoxifeno siendo la única diferencia que las inyecciones intratumorales diarias se realizan a una concentración de 40 µM para la PBPE para unos volúmenes de inyección de 100 µl. Los resultados están recogidos en la siguiente tabla 5:

Molécula	Día 28		Día 37	
	Tamaño del tumor (% del control)	OCDO (% del control)	Tamaño del tumor (% del control)	Tamaño del tumor (% del control)
Control no tratado	100	100	100	100
PBPE	71,6 ± 7	22,5 ± 5	54,5 ± 8	9,6 ± 5

- 20 Se ha determinado por tanto *in vivo* que la PBPE inhibe por una parte el OCDO y por otra parte hace que los tumores disminuyan.

- 25 **Ejemplo 7:** inhibición de la producción del OCDO por parte de la PBPE en diversas células tumorales. El ensayo 2 proporcionado previamente ha demostrado que los extractos celulares de células tumorales MCF7 incubadas durante 3 días en disoluciones de PBPE conducen a la constatación de una inhibición del metabolito que se ha identificado como el OCDO.

- 30 Se ha retomado un experimento análogo con líneas diferentes incubando las células ensayadas durante 48 horas en una disolución de PBPE 40 µM. Se ha constatado que el OCDO era inhibido al 100 % en todas las líneas ensayadas de la siguiente tabla:

Línea celular	Tipo	Inhibición de la producción del OCDO
MCF-7	Carcinoma de mama humano	100 %
MDA-MB-231	Carcinoma de mama humano	100 %
A-549	Carcinoma de mama humano	100 %
B-16-F10	Melanoma murino	100 %
U-937	Leucemia humana	100 %
HT-29	Carcinoma de colon humano	100 %
HeLa	Carcinoma de útero humano	100 %
C6	Glioma de rata	100 %
SH-N-SH	Neuroblastoma humano	100 %

Línea celular	Tipo	Inhibición de la producción del OCDO
Saos-2	Osteosarcoma humano	100 %
P19	Línea de carcinoma embrionario murino	100 %
TT	Carcinoma medular de tiroides humano	100 %

De forma general, para establecer los porcentajes de inhibición del OCDO a partir de las placas de cromatografía en capa fina (CCM) obtenidas como en el ensayo 2, los metabolitos radioactivos son identificados y cuantificados a partir de dichas placas utilizando una placa sensible al europio de tipo « GP Phosphorescreen » (GE Healthcare) y un « Phosphor Imager Storm 840 » (GE Healthcare). La proporción de oxisteroles radiomarcados se determina en el autorradiograma obtenido por densitometría utilizando el programa informático « Image 5 Quant 5.2 ». El porcentaje se calcula a partir de la proporción entre la cantidad de oxisteroles cuantificados dividida por la suma de las cantidades de oxisteroles (CEE + CE + CT + OCDO). El CEE (éster de CE) procede exclusivamente del CE, el porcentaje de CE se calcula a partir de la proporción $(CE + CEE) / (CE + CEE + CT + OCDO)$.

Ejemplo 8: el OCDO es inhibido cuando la ChEH está inactiva.

Como se ha establecido previamente en esta solicitud de patente, se sabe que las células tumorales producen OCDO, lo que implica que la hidrolasa ChEH está activa, ya que permite la transformación del CE en CT, lo que es un paso obligado para la producción del OCDO. Como se establecerá en la tabla 1 proporcionada más adelante en este ejemplo, el tamoxifeno, la PBPE, el raloxifeno y la DPPE son inhibidores de la ChEH. Se ha completado por tanto el ensayo 2 proporcionado previamente midiendo las cantidades de los productos presentes cuando las células tumorales MCF7 se incuban como se ha indicado con detalle en el ensayo 2. El cálculo de los porcentajes de CE, de CT y de OCDO se ha realizado como se indicó en el ejemplo 7. Los resultados se proporcionan en la figura 21, que muestra una placa de cromatografía en capa fina en la que las pistas correspondientes a las incubaciones de las células con el disolvente de vehículo T (0,1 % de etanol en tampón de PBS), con CE y con cuatro inhibidores de la ChEH cuyos identificadores se proporcionan bajo las pistas. Los valores numéricos obtenidos están recogidos en la siguiente tabla:

Compuestos	% de CE	% de OCDO	% de CT
EtOH (T)	0	73,1	26,9
CE α 10 μ M	31,5	27	41,5
Tam 2,5 μ M	90,3	6,9	2,8
PBPE 10 μ M	89,2	6,2	4,6
Ral 10 μ M	96,5	0,5	3
DPPE 1,5 μ M	80,7	8,8	10,5
T = control			
DPPE = N,N-dietil-2-(4-bencilfenoxi) etanamina			
Ral = raloxifeno			

Se constata que una inhibición de la ChEH implica claramente una inhibición del OCDO, estando por lo tanto el producto CT en una cantidad 5 muy reducida.

De hecho, la formación del OCDO en una célula depende de varios parámetros:

1. la presencia de colesterol
 2. la presencia de CE
 3. la presencia de la hidrolasa de epóxido de colesterol (ChEH)
 4. la presencia de CT
 5. el transporte del CT hacia la zona de oxidación del CT en OCDO
 6. la presencia y la actividad de la enzima responsable de la oxidación del CT en OCDO
- Para establecer la bien fundada relación existente entre la capacidad de diversos compuestos de inhibir el OCDO en una célula tumoral MCF7, por un lado, y su cualidad de inhibidor de la ChEH, por otro lado, se han calculado los coeficientes de inhibición K_i para la ChEH relativos a un cierto número de productos, y se ha medido la producción del OCDO por parte de las MCF7 después de la incubación de las células con los mismos productos según el protocolo definido en el ensayo 2 de la presente solicitud de patente. El conjunto de los resultados está presentado en las tablas 1 y 2. A partir de estas dos tablas, parece que cualquier inhibidor de la enzima implicado en la biosíntesis de colesterol implica una disminución del colesterol utilizable para la producción del OCDO. Se apreciará, en particular, desde los inhibidores de las enzimas a partir de la sintetasa de hidroximetilglutaril Coenzima A (sintetasa de HMG CoA) hasta la reductasa de 7-deshidrocolesterol y la reductasa de 24-deshidrocolesterol.

Se ha realizado un experimento en esta categoría de inhibidores, a saber, con un inhibidor de la reductasa de HMG-coA, tal como la « lovastatina », utilizado a una concentración de 10 μ M: se ha constatado que después de una incubación de las células MCF7 según el protocolo proporcionado en el ensayo 2 y llevando el control al valor de 100, se obtiene una producción del OCDO para las MCF7 de menos de 1.

5

TABLA 1

	Molécula	K _i de la ChEH (nM)
Ligandos de AEBS	PBPE	26,8 \pm 6
	PCPE	34,7 \pm 8
	Tesmilifeno	62,4 \pm 3
	DDA	1250,4 \pm 6
Moduladores de los receptores de estrógenos	Tamoxifeno	33,6 \pm 8
	4OH-Tamoxifeno	145,3 \pm 4
	Raloxifeno	35,6 \pm 4
	Nitromifeno	17,7 \pm 6
	Clomifeno	9,0 \pm 2
	RU 39,411	155,2 \pm 8
Ligandos de los receptores sigma	BD-1008	98,7 \pm 9
	Haloperidol	18067 \pm 14
	SR-31747A	6,2 \pm 2
	Ibogaína	2150 \pm 11
	AC-915	3527 \pm 9
	Rimcazol	2325 \pm 8
	Amiodarona	733,1 \pm 9
	Trifluoroperacina	135,4 \pm 7
Inhibidores de la biosíntesis del colesterol	Ro 48-8071	88,9 \pm 5
	U-18666A	90,3 \pm 5
	AY-9944	649 \pm 6
	Triparanol	39,5 \pm 3
	Terbinafina	9105 \pm 33
	SKF-525A	1904 \pm 11

TABLA 2

	Molécula (concentración en μ M)	Producción del OCDO por parte de las MCF-7 (% del control)
Control	-	100
Ligandos de AEBS	PBPE (1)	< 1
	PCPE (1)	< 1
	Tesmilifeno (1)	< 1
	DDA	< 1
Moduladores de los receptores de estrógenos	Tamoxifeno (1)	< 1
	40H-Tamoxifeno (1)	< 1
	Raloxifeno (1)	< 1
	Nitromifeno (1)	< 1
	Clomifeno (1)	< 1
	RU 39,411 (5)	< 1
Ligandos de los receptores σ	BD-1008 (1)	< 1

	Molécula (concentración en μM)	Producción del OCDO por parte de las MCF-7 (% del control)
	Haloperidol (100)	42
	SR-31747A (1)	< 1
	Ibogaína (5)	25
	AC-915 (10)	16
	Rimcazol (5)	12
	Amiodaron (5)	8
	Trifluoroperacina (1)	< 1
Inhibidores de la biosíntesis del colesterol		
	Ro 48-8071 (10)	<1
	U-18666A (1)	<1
	AY-9944 (5)	<1
	Triparanol (1)	<1
	Terbinafina (10)	<1
	SKF-525A (10)	<1

Los productos que aparecen en las tablas 1 y 2 y que no han sido previamente identificados en el presente texto, están definidos por su nombre químico en la siguiente lista:

- 5 PCPE: 1-(2-(4-(2-fenilpropan-2-il)fenoxi)etil) pirrolidina;
tesmilifeno: 2-(4-benzilfenoxi)-N,N-dietiletanamina,.
- tamoxifeno: 2- [4- [(Z)-1,2-di(fenil)but-1-enil]fenoxi]-N,N-dimetiletanamina;
40H-tamoxifeno: 4- [(Z)-1- [4-(2-dimetilaminoetiloxi)fenil]-2-fenilbut-1-enil]fenol;
10 raloxifeno: [6-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-1-benzotiofen-3-il]- [4-(2-piperidin-1-iletoksi) fenil] metanona;
nitromifeno: 1- [2- [4- [(Z)-1-(4-metoxifenil)-2-nitro-2-feniletetil]fenoxi] etil] pirrolidina;
clomifeno: 2- [4- [(Z)-2-cloro-1,2-di(fenil)etenil]fenoxi]-N,N-dietiletanamina;
RU 39411: 11- [4-W,W- [dietilaminoetoxi]fenil]-estra-1,3,5(10) trien-3,17-diol.
- 15 BD-1008: N-(3,4-diclorofenotil)-N-metil-2-(pirrolidin-1-il) etanamina;
Haloperidol: 4-(4-(4-clorofenil)-4-hidroxipiperidin-1-il)-1-(4-fluorofenil) butan-1-ona;
SR-31747A: (E)-N-(4-(3-cloro-4-ciclohexilfenil)but-3-enil)-N-etilciclohexanamina;
AC915: N-(3,4-diclorofenotil)-N-metil-2-(pirrolidin-1-il) etanamina
Rimcazol: 9- [3- [(3S,5R)-3,5-dimetilpiperacina-1-il]propil] carbazol
20 Amiodarona: (2-butil-1-benzofuran-3-il)- [4-(2-dietilaminoetiloxi)-3, 5-diiodofenil] metanona
Trifluoroperacina: 10- [3-(4-metilpiperacina-1-il)propil]-2-(trifluorometil) fenotiaccina
- RO 48-8071: (4-(6-(alil(metil)amino)hexiloxi)fenil)(4-bromofenil) metanona;
U-18666A: 3-beta-(2-(dietilamino)etoxi)androst-5-en-17-ona;
- 25 AY-9944: trans-1,4-cis(2-clorobenzaminometil) ciclohexano;
Triparanol: 2-(4-clorofenil)-1-(4-(2-(dietilamino)etoxi)fenil)-1-p-toliletanol;
terbinafina: (E)-N,3,6,6-tetrametil-N-(naftalen-1-ilmetil)hept-2-en-4-in-1-amina;
SKF-525A: pentanoato de 2-dietilaminoetil,2,2-difenilo.
- 30

Los inhibidores que han sido el objeto de los experimentos que han tenido éxito en las tablas 1 y 2 incluyen los moderadores de los receptores de estrógenos, los ligandos de los sitios de unión de la membrana de los antiestrógenos (AEBS), los ligandos de los receptores sigma 1 y 2, los inhibidores de la biosíntesis del colesterol a partir de la sintetasa de escualeno y hasta la reductasa de 7- y de 24-deshidrocolesterol. Todos estos inhibidores tienen un punto en común, a saber, el de ser ligandos de los sitios AEBS.

35

A continuación se han detallado los protocolos utilizados para la medición de los coeficientes de inhibición K_i de la Tabla 1:

- 40 a) K_i para los AEBS

La K_i es la constante de inhibición correspondiente a la molécula de interés, y se mide de la siguiente forma: se incuban microsomas de hígado de rata con una concentración de 2,5 nM de tamoxifeno tritiado (proporcionado por

la compañía GE healthcare) y unas concentraciones crecientes de inhibidor comprendidas entre 0,01 y 1.000 μM en las condiciones descritas en la siguiente publicación: Poirot M. et al, *Bioorg Med Chem* 2000, vol. 8 (8), págs. 2007 - 2016. Las CI_{50} , correspondientes a la concentración de inhibidor requerida para inhibir el 50 % de la actividad de la ChEH, E se determinan mediante la utilización de un programa de tratamiento de datos « GraphPad Prizm (versión 4) ». Las K_i se calculan mediante la utilización de la ecuación de Cheng y Prusoff (Cheng y Prusoff, *Biochem Pharmacol*, 1973, vol. 22 (23), páginas 3099 - 3108). La K_i se expresa según la ecuación: $\text{K}_i = [\text{CI}_{50}] (1 + ([\text{tamoxifeno tritiado}] / \text{K}_d))$. La concentración de tamoxifeno tritiado es de 2,5 nM y la constante de disociación en equilibrio del tamoxifeno tritiado para los AEBS es de 2 nM.

10 b) Determinación de la K_i para la ChEH:

Se incuban 150 μg de proteínas de microsomas de hígado de rata en presencia de 2 concentraciones de CE α [^{14}C] con concentraciones crecientes de inhibidores comprendidas entre 0,01 y 1.000 μM en las condiciones descritas previamente para la medición de la actividad de la ChEH. La K_i se mide como la proyección en el eje de abscisas de la intersección de las líneas obtenidas llevando a la gráfica los valores de $1/V$ en función de $1/S$ para la ChEH, tal y como se determina mediante el método de Dixon (Dixon M, *Biocheml J*, 1953, vol. 55 (1), págs. 170 - 171).

Ejemplo 9: inhibición del OCDO por parte de un inhibidor de los citocromos P450.

20 La epoxidación del colesterol puede ser producida mediante una autooxidación del colesterol con el oxígeno del aire, por la acción de enzimas como los citocromos P450 o las lipoxigenasas (véase Schroepfer G. Jr, *Physiological Reviews*, Vol. 80, n° 1, págs. 361 - 554, 2000).

25 Se ha constatado una inhibición de la producción del epoxiesterol CE y de sus derivados, el CT y el OCDO, con la utilización de un inhibidor general de los citocromos P450, a saber, el ketoconazol (véase la figura 22).

El protocolo para este experimento es el mismo que el descrito en el ejemplo 7.

Ejemplo 10: inhibición de la ChEH por parte de un aminoalquil esterol.

30 Para este experimento se ha elegido un aminoalquil esterol incluido en la patente francesa 2 838 741, (y véase también: de Médina et al, *J Med Chem*: 2009, Vol. 52, n° 23, págs. 7765 - 7777) que tiene como fórmula: colestano-3 β ,5 α -diol6 β -N-[2-(3H-imidazol-4-il)-etilamino] (DDA). Se han incubado células tumorales MCF7 con CE [^{14}C] (10 mCurie/mmol, 0,6 μM) durante 48 horas en presencia o en ausencia del aminoalquil esterol mencionado anteriormente (a unas concentraciones de 0,1 y 1 μM).

35 Se ha realizado una cromatografía en capa fina, cuya placa se ha reproducido en la figura 23. En esta placa se realiza la incubación para la pista 1 con CE [^{14}C]; para la pista 2, con CT [^{14}C]; para la pista 3, con el disolvente de vehículo, que es el mismo que el utilizado para los ensayos 1 a 5; para la pista 4, con CE [^{14}C] y 0,1 μM del aminoalquil esterol; y para la pista 5, con CE [^{14}C] y a una concentración de 1 μM del aminoalquil esterol.

Se observa que la presencia del aminoalquil esterol implica una inhibición de la ChEH; esta inhibición es dependiente de la concentración del aminoalquil esterol.

45 Por otro lado, se ha realizado igualmente un estudio de esta inhibición en un homogeneizado. El protocolo es el siguiente: las células MCF7 se desprenden con tripsina y se recogen en medio RPMI al 5 % de FBS. La suspensión celular obtenida (60 millones de células) se centrifuga, se lava con PBS frío y se resuspende en un 1 ml de tampón Tris-HCl 20 (pH = 7,4; KCl 150 mM). Las células se lisan con cinco ciclos de congelación / descongelación (nitrógeno líquido / 37 °C). La disolución se centrifuga a 1.200 vueltas/min a 4 °C durante 10 minutos. Se recupera el sobrenadante y se determina la cantidad de proteínas mediante el método de Bradford. La medición de la actividad de ChEH sobre el lisado celular MCF7 se realiza como sigue: se mide la actividad enzimática en 150 μg de proteínas en un volumen final de 150 μl que comprenden 125 μl de tampón de ChEH (tris HCl, pH 7,4, KCl 150 mM) y 15 μl de proteínas de MCF7. Se han comparado los valores de las CI_{50} y se ha constatado que $(\text{CI}_{50})_{\text{células}} = 0,6 \mu\text{M}$ mientras que $(\text{CI}_{50})_{\text{homogeneizado}} = 11,2 \mu\text{M}$.

55 Esta diferencia entre las CI_{50} demuestra que el aminoalquil esterol ensayado presenta unas propiedades de prevención de la aparición de cánceres.

60 Por otro lado, se ha determinado que para el compuesto DDA, unos resultados análogos a los presentados en el ejemplo 6 para el PBPE. El protocolo utilizado es estrictamente idéntico al que se ha detallado en el ejemplo 5 para el tratamiento con tamoxifeno, siendo la única diferencia que las inyecciones intratumorales diarias se realizan a una concentración de 10 μM para unos volúmenes de inyección de 100 μl . Los resultados están recogidos en la siguiente tabla:

65

Molécula	Día 28		Día 37	
	Tamaño del tumor (% del control)	OCDO (% del control)	Tamaño del tumor (% del control)	OCDO (% del control)
Control no tratado	100	100	100	100
DDA	65,4 ± 7	14,5 ± 3	28,3 ± 8	4,5 ± 3

Se ha establecido por tanto, en este ejemplo, que por un lado, el producto DDA inhibe el OCDO y que, por otro lado, *in vivo*, reduce el tamaño del tumor.

5 **Ejemplo 11:** inhibición del OCDO por parte de los moduladores del transporte intracelular de colesterol y de los moduladores de los receptores de arilhidrocarburo (receptor Ahr).

10 Se han ensayado dos moduladores del transporte intracelular del colesterol, a saber, la progesterona y el « U18666A » (3-β-(2-(20 (dietilamino)etoxi)androst-5-en-17-ona) (véase LISCUM L et al., J. Biol. Chem., vol. 270 (26) págs. 15443 - 15446, 1995) (pistas 2 y 3, respectivamente).

15 Igualmente se han ensayado (véanse las pistas 4 y 5, respectivamente) dos moduladores de los receptores Ahr (receptor de arilhidrocarburo), a saber, la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) y el benzo(A)pireno. Finalmente se han ensayado dos antagonistas de los receptores Ahr, a saber, el resveratrol y el 1,3-dicloro-5- [(1E)-2-(4-clorofenil)etenil]-5 benceno (PDM2) (véase: « Casper R. F. et al, Mol. Pharmacol., octubre de 1999.; 56 (4); 784 - 90 » y « de Medina et al, J. Med Chem., 13 de enero de 2005; 48 (1): 287 - 91 »).

20 Se han realizado los siguientes experimentos: las células tumorales MCF7 se ha puesto en presencia de 0,5 μM de CT [¹⁴C] y a continuación se han incubado durante 24 horas en presencia de uno de los siguientes productos:

1. disolvente de vehículo (0,1 % de etanol en un tampón de PBS) que sirve de control (pista 1)
2. 10 μM de progesterona
3. 10 μM de U18666A
4. 100 nM de TCDD
- 25 5. 10 μM de benzo(A)pireno
6. 10 μM de resveratrol
7. 10 μM de PDM2 (Ant. 1)

30 Se han realizado cromatografías en capa fina y la figura 24 representa la placa obtenida. A partir de las manchas de las diferentes pistas se ha cuantificado, aplicando el protocolo detallado en el ejemplo 7, la producción del OCDO en las células tratadas. Los resultados de esta cuantificación están representados por el histograma de la figura 24.

35 Además, se han medido las cantidades del OCDO producidas por las células 25 MCF7 cuando se han incubado según el mismo protocolo que el definido anteriormente con otros antagonistas de los receptores Ahr, llevándose el control a 100 y expresándose la producción del OCDO en % del control (mismo control que anteriormente). Los resultados se proporcionan en la siguiente tabla:

	Molécula (concentración 10 μm)	Producción del OCDO por les MCF-7 (% del control)
Control	-	100
Antagonista de los receptores Ahr	Resveratrol	< 1
	Ant 1 (10)	< 1
	Ant 2 (10)	< 1
	Ant 3 (10)	< 1
	Ant 4 (10)	< 1
	Ant 5 (10)	< 1

Ant. 1: (E)-1-(4'-clorofenil)-2-(3,5-diclorofenil)-eteno;
 Ant. 2: (E)-1-(4'-metoxifenil)-2-(3,5-fluorofenil)-eteno;
 Ant. 3: (E)-1-(4'-fluorofenil)-2-(3,5-fluorofenil)-eteno;
 Ant. 4: (E)-1-(4'-trifluorometil-fenil)-2-(3,5-rifluorometil-fenil)-eteno;
 Ant. 5: (E)-1-(4'-fluorofenil)-2-(3,5-dimetoxifenil)-eteno.

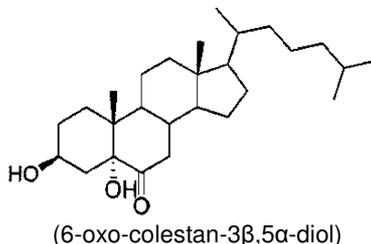
Parece por tanto que los moduladores del transporte intracelular del colesterol y los antagonistas de los receptores Ahr pueden inhibir la formación del OCDO y ser utilizados en consecuencia por su efecto antineoplásico.

5 **Lista de secuencias**

- <110> INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) AFFICHEM
- 10 <120> Métodos para la determinación del estado oncogénico de una célula, sus aplicaciones, y métodos para el tratamiento del cáncer
- <130> BCT100197
- 15 <160>4
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 20 <211>21
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <223> Primer
- <400> 1
- aaaccaaacc acaagacaga c 21
- <210>2
- 30 <211> 18
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- 35 <223> Primer
- <400> 2
- gctgaaggca tctcggag 18
- <210>3
- 40 <211>21
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- 45 <223> Cebador
- <400> 3
- 50 ctatggtgag ccgtgattgt g 21
- <210>4
- <211>21
- <212> ADN
- 55 <213> Artificial
- <220>
- <223> Cebador
- <400> 4
- 60 tctgtgcat cctcctgtgt c 21

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida de un sujeto, que comprende una etapa en la que se determina la cantidad del compuesto OCDO de fórmula



- 5 presente en dichas células.
- 10 2. Método para el diagnóstico de un cáncer en un sujeto, que comprende una etapa de detección del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida de un sujeto según el método de la reivindicación 1 en el que una cantidad de OCDO superior a un valor de referencia medido en las células de una muestra de un sujeto sano es indicativa de un estado oncogénico de las células de dicha muestra.
- 15 3. Método para seguir la respuesta a un tratamiento de un sujeto que padece un cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de detección, antes y en el transcurso del tratamiento, del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida de dicho sujeto según el método de la reivindicación 1; siendo un cambio en el estado oncogénico del sujeto en el transcurso del tratamiento indicativo de una respuesta del
- 20 sujeto a dicho tratamiento.
4. Método para la evaluación de la eficacia de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en un sujeto afectado por dicho cáncer, que comprende:
- 25 (a) una etapa de detección del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida de un sujeto según el método de la reivindicación 1 en la que se cuantifica la concentración D1 del OCDO en un extracto líquido de las células de una muestra obtenida de dicho sujeto;
- (b) después de un tiempo de tratamiento terapéutico, una etapa de detección del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida de un sujeto según el método de la reivindicación 1 en la que se cuantifica la
- 30 concentración D2 del OCDO en un extracto líquido de las células de una muestra obtenida de dicho sujeto de la misma forma que en la etapa (a);
- (c) una etapa de comparación entre D1 y D2; y
- (d) si $D2 < D1$, se deduce que el medicamento es eficaz para el tratamiento de dicho cáncer.
- 35 5. Método para la evaluación de la eficacia de un tratamiento del cáncer en un sujeto afectado por dicho cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de detección, antes y durante el tratamiento, del estado oncogénico de las células de una muestra obtenida de dicho sujeto según el método de la reivindicación 1; siendo un cambio en el estado oncogénico o en el diagnóstico del sujeto durante el tratamiento, indicativo de la eficacia de dicho tratamiento para el tratamiento del cáncer.
- 40 6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5 en la que la muestra es una muestra de sangre.
7. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5 en la que la muestra es una biopsia.
- 45 8. Método según la reivindicación 1 o 2 en la que la muestra es una biopsia de un tejido que se sospecha que es canceroso.
9. Método según la reivindicación 1, 3, 4 ó 5 en la que la muestra es una biopsia de un tejido canceroso.
- 50 10. Utilización del compuesto OCDO presente en las células de una muestra obtenida de un sujeto como marcador del estado oncogénico de dichas células.
11. Inhibidor del OCDO destinado para utilizarse en un método de tratamiento de un cáncer en el ser humano o en un animal, **caracterizado porque** se elige de entre:
- 55 - los inhibidores de la actividad de hidrolasa de epóxido de colesterol (ChEH) elegidos de entre el grupo que consiste en el Ro 48-8071 y la ibogaína.

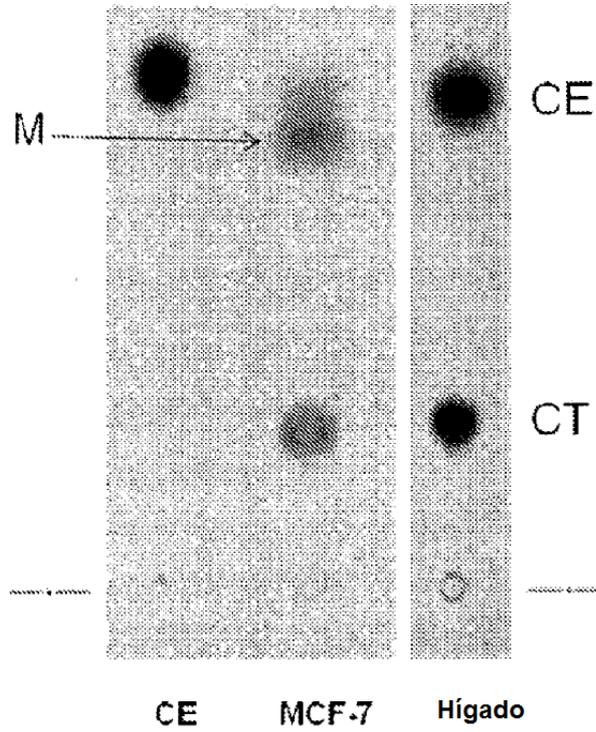


FIG. 1

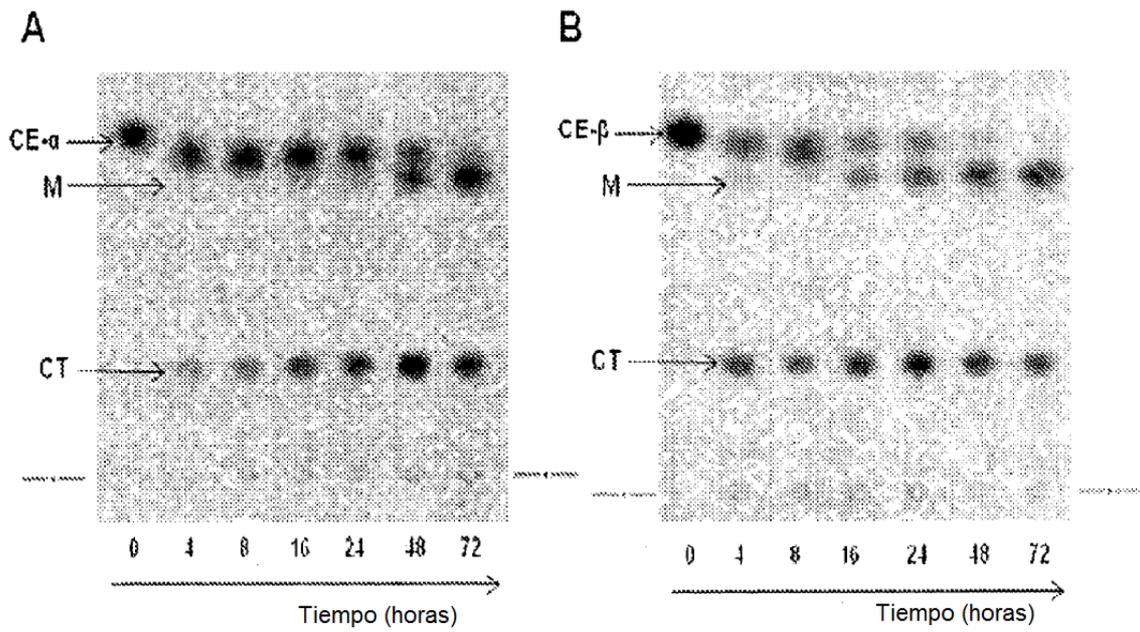


FIG. 2

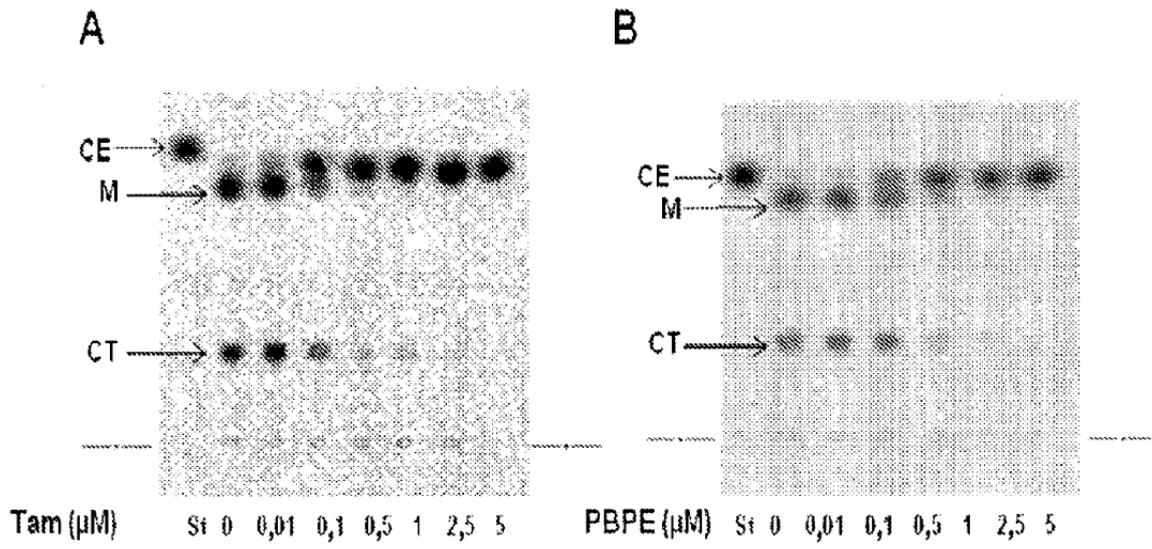


FIG. 3

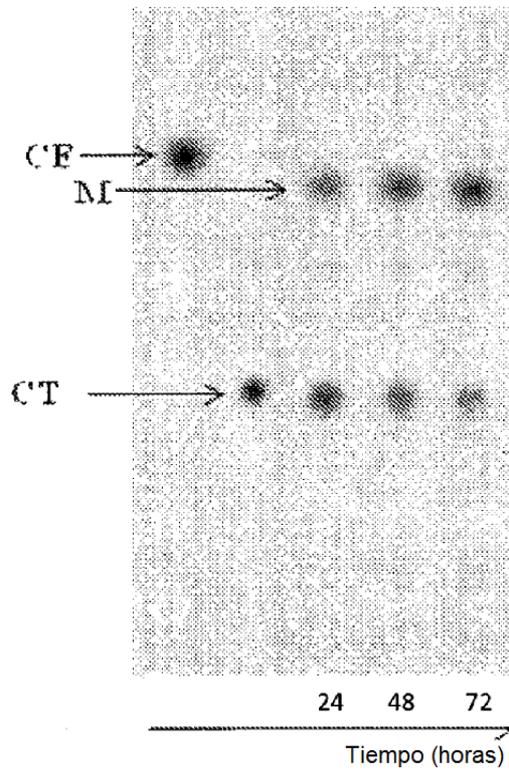


FIG. 4

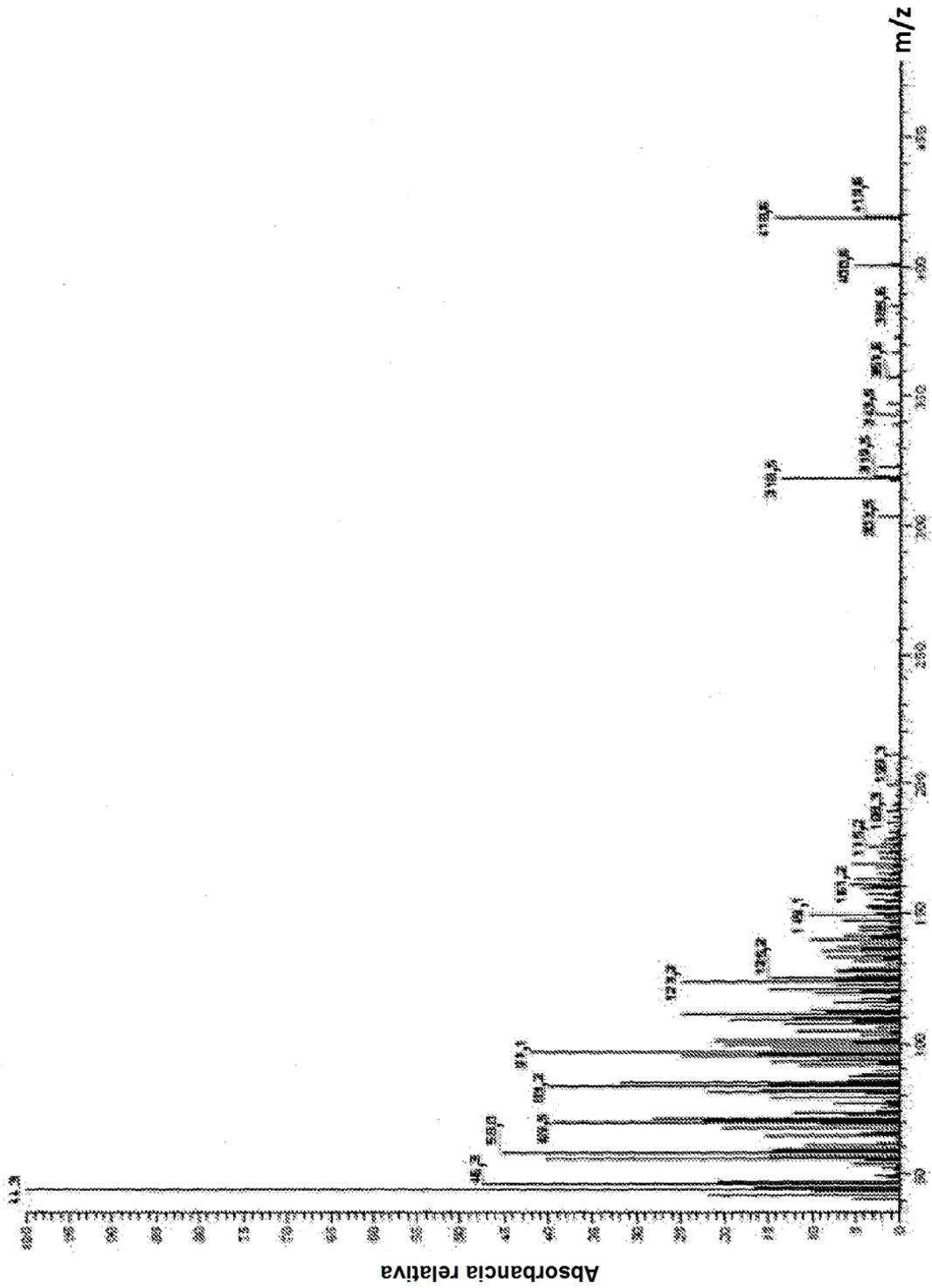


FIG. 5

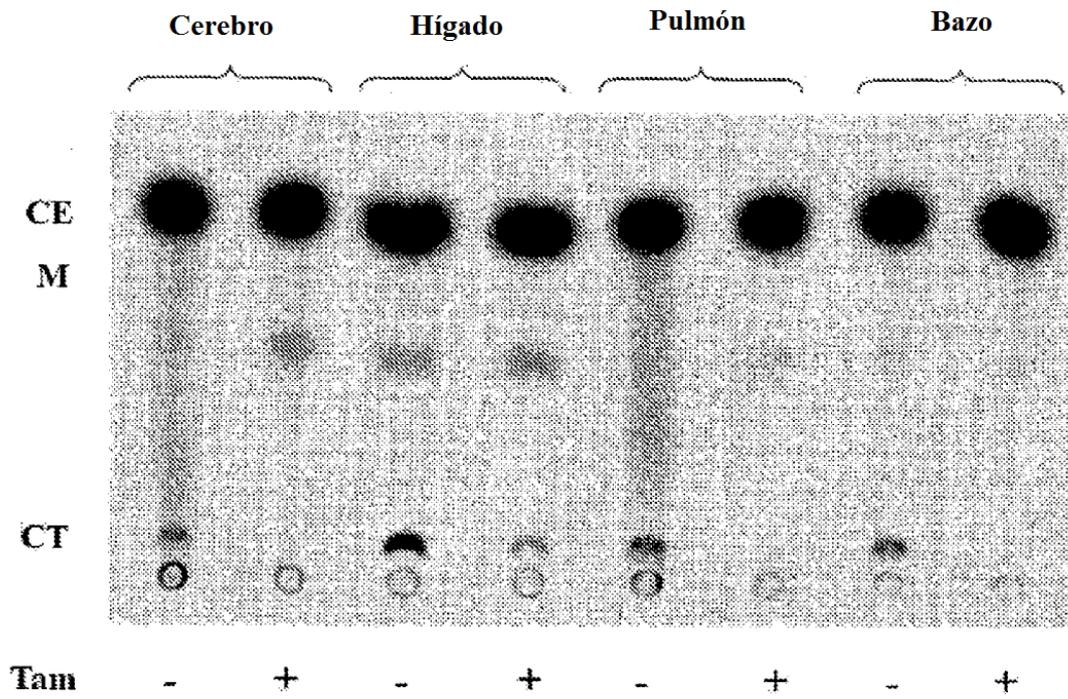


FIG. 6

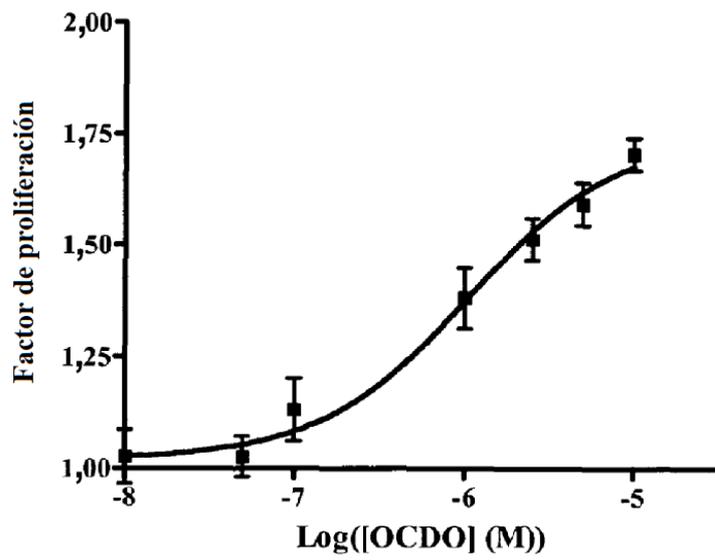


FIG. 7

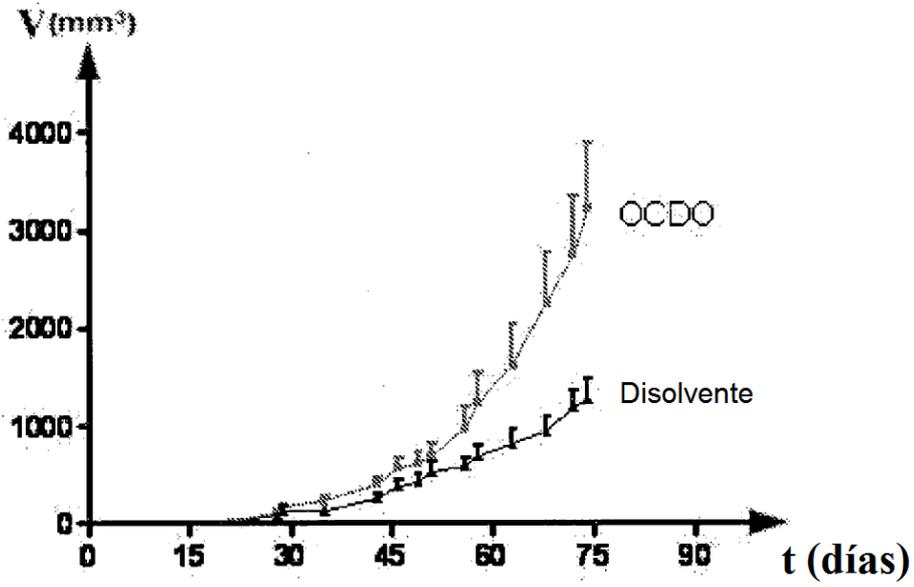


FIG. 8

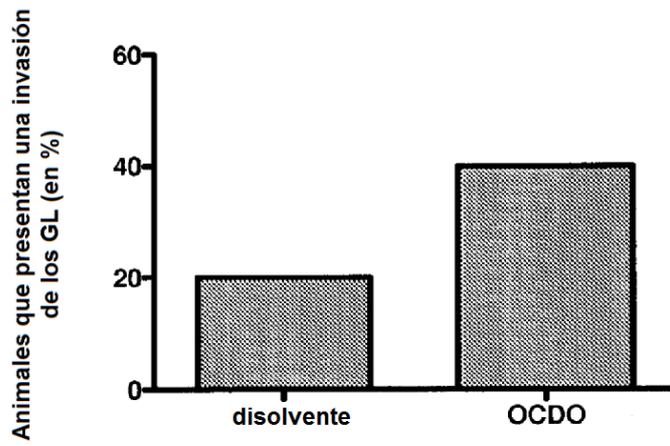
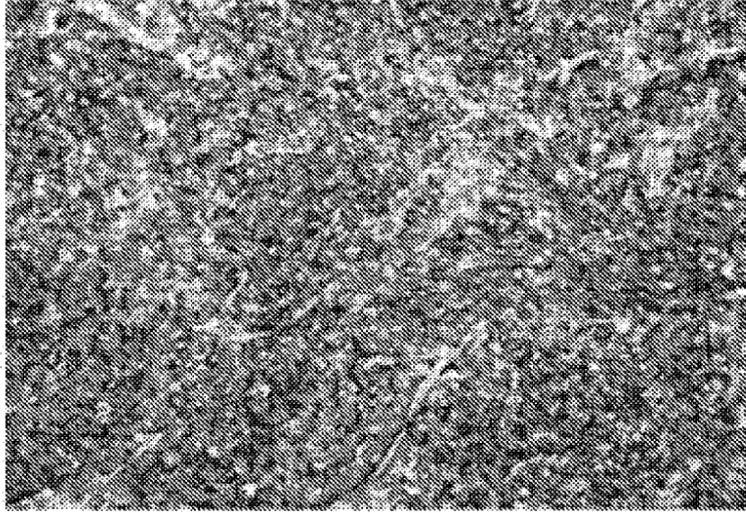
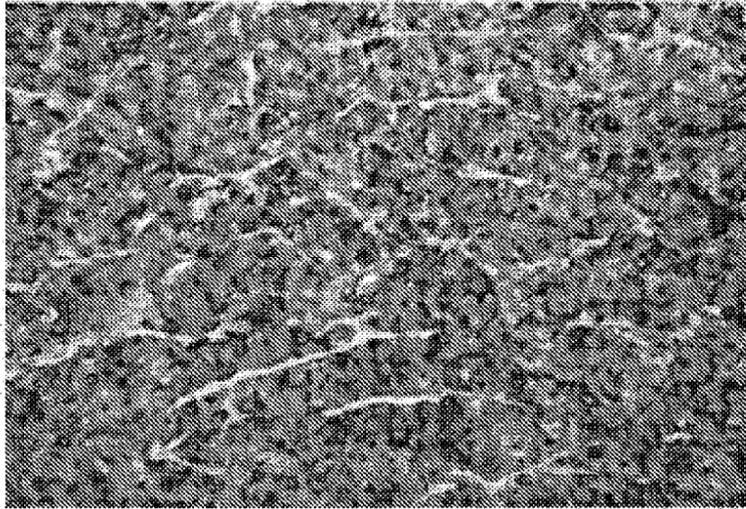


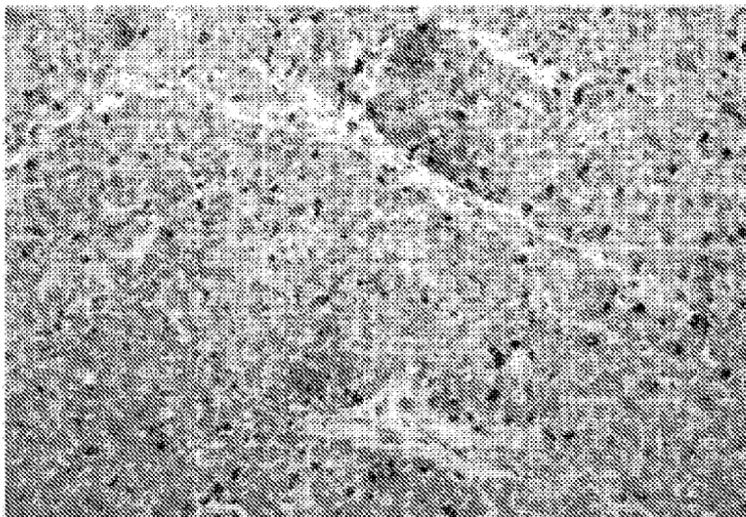
FIG. 9



EMA



Calcitonina



Citoqueratina

FIG. 10

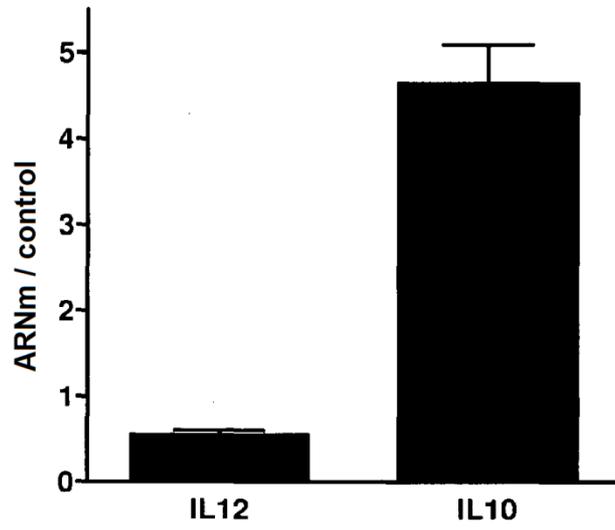


FIG. 11

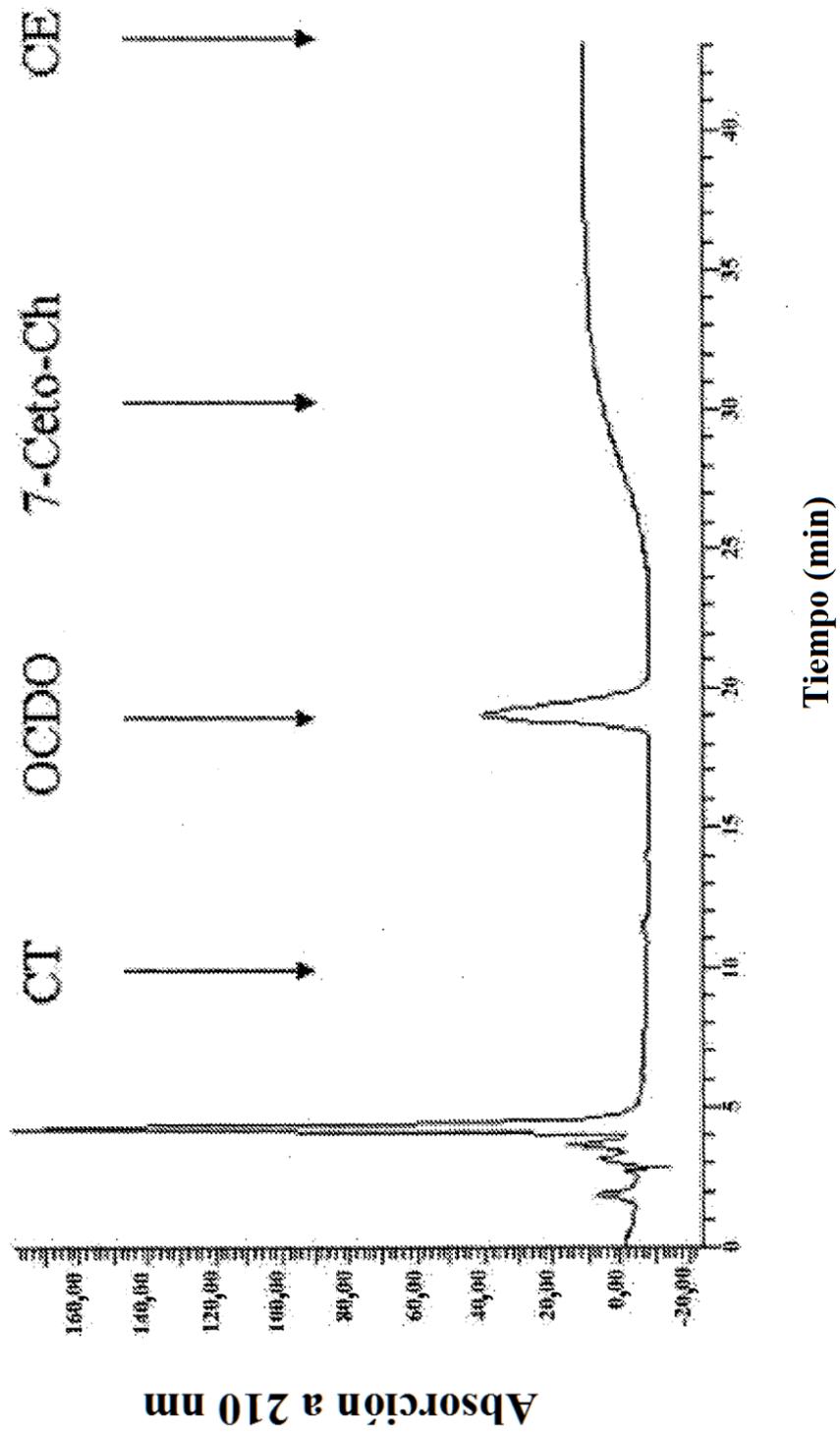


FIG. 12

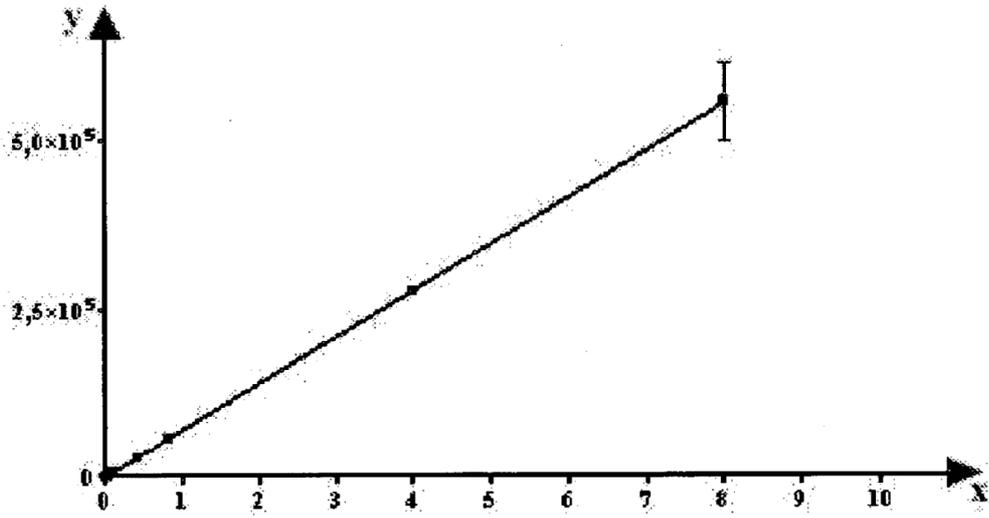


FIG. 13

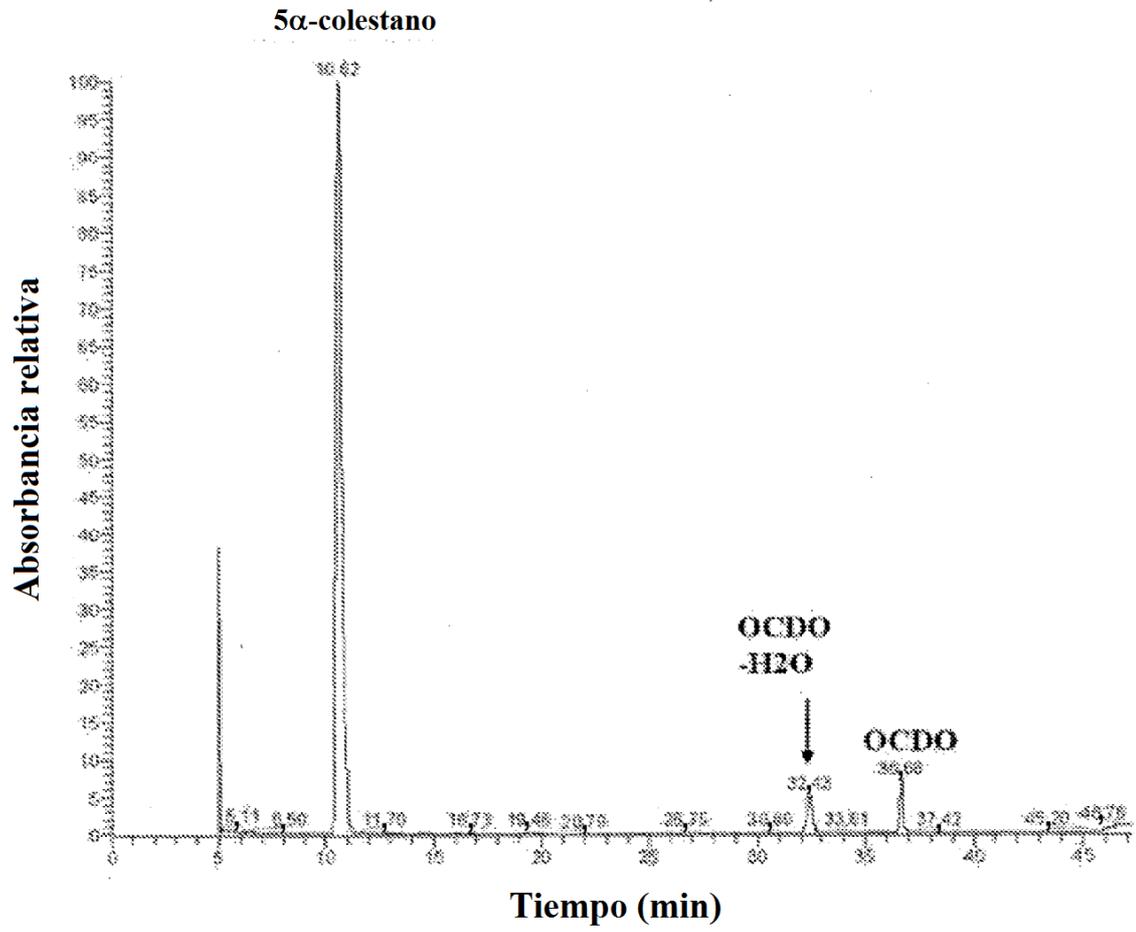


FIG. 14

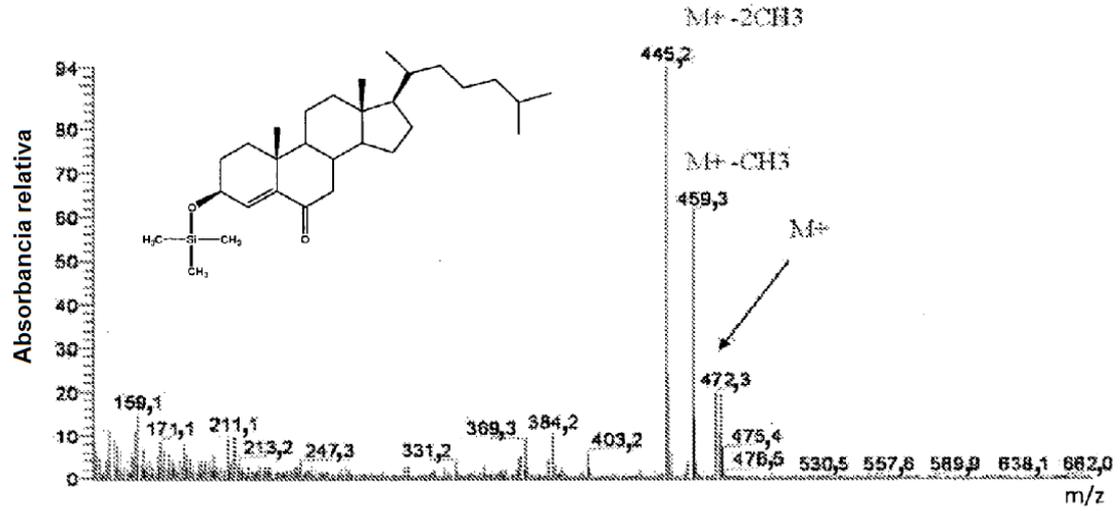


FIG. 15

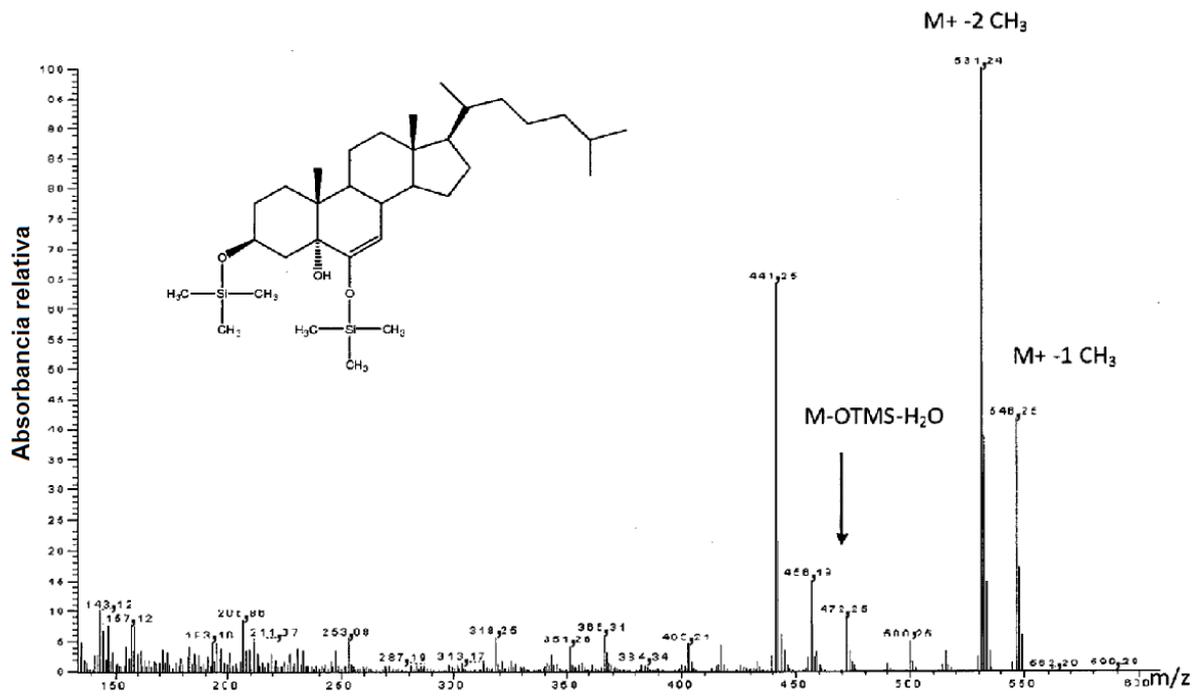


FIG. 16

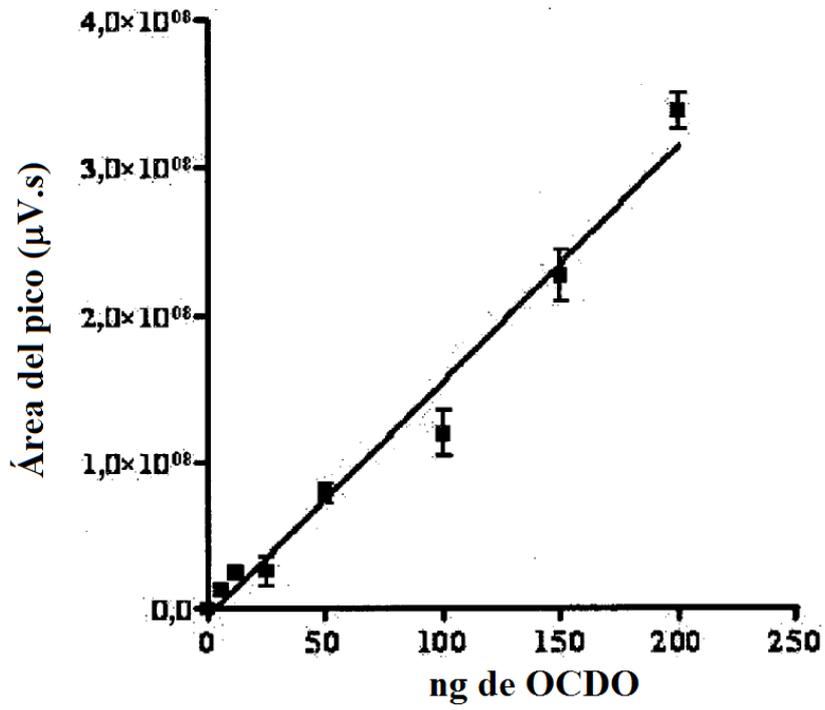


FIG. 17

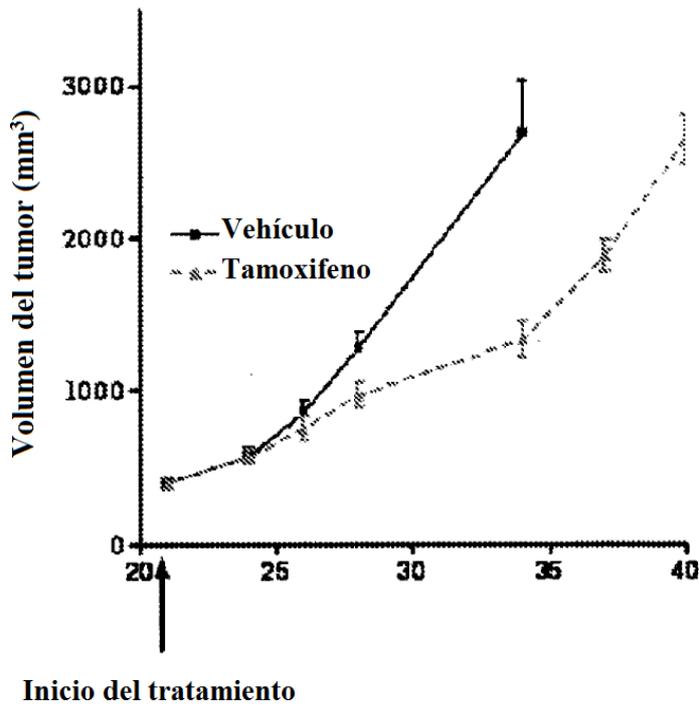


FIG. 18

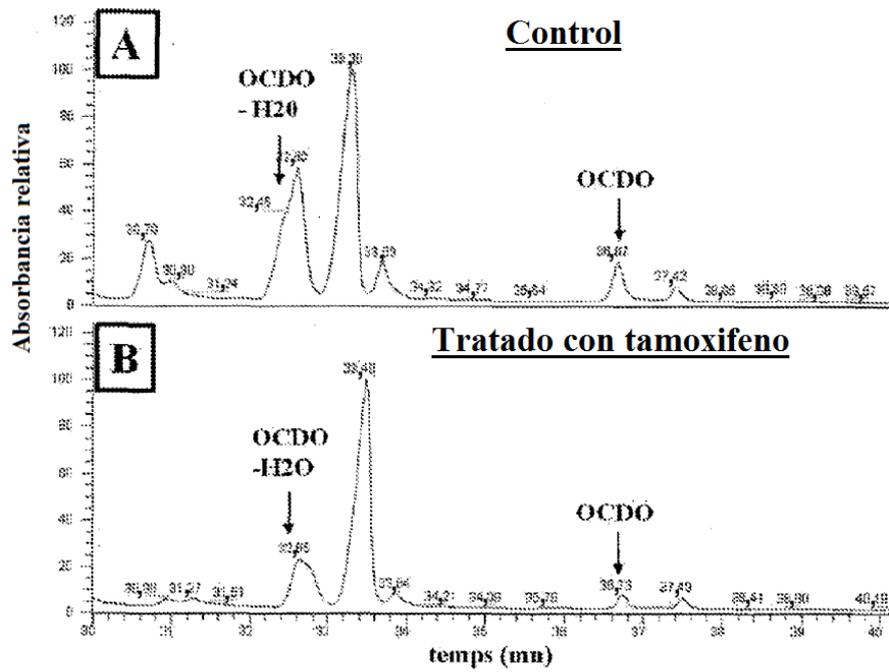


FIG. 19

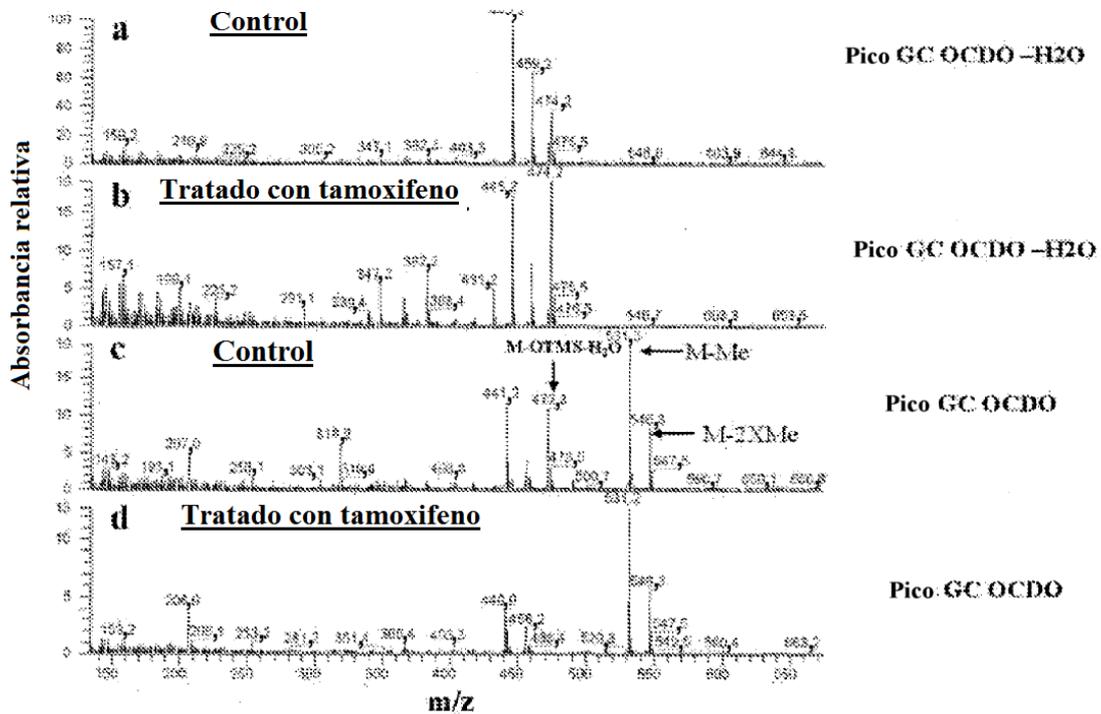


FIG. 20

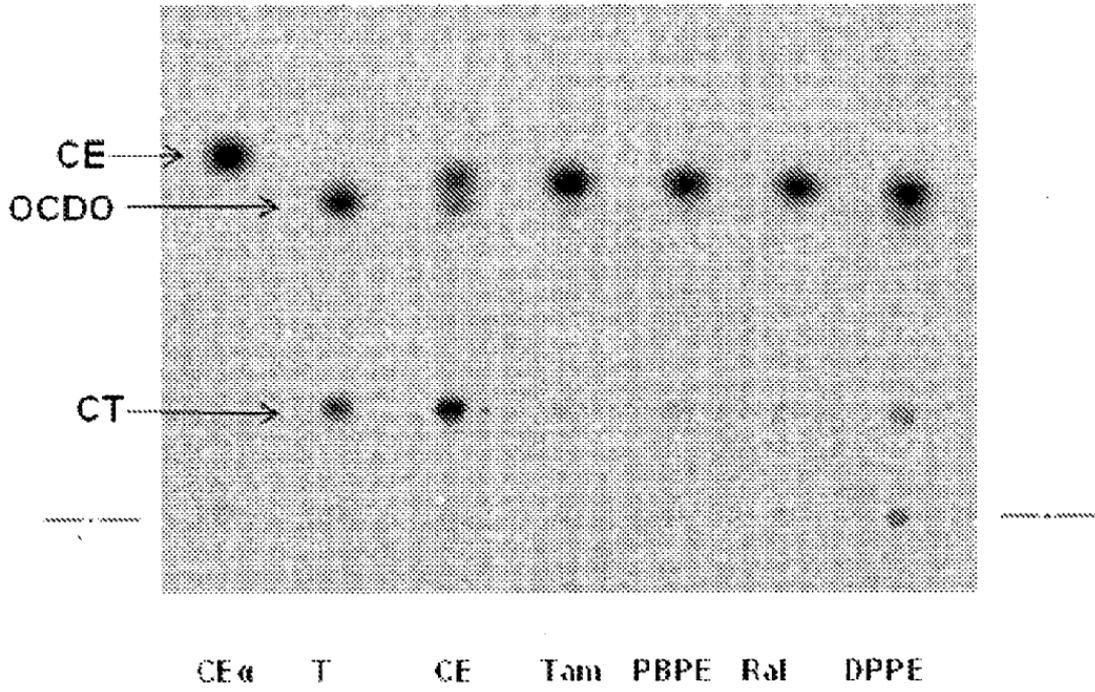


FIG. 21

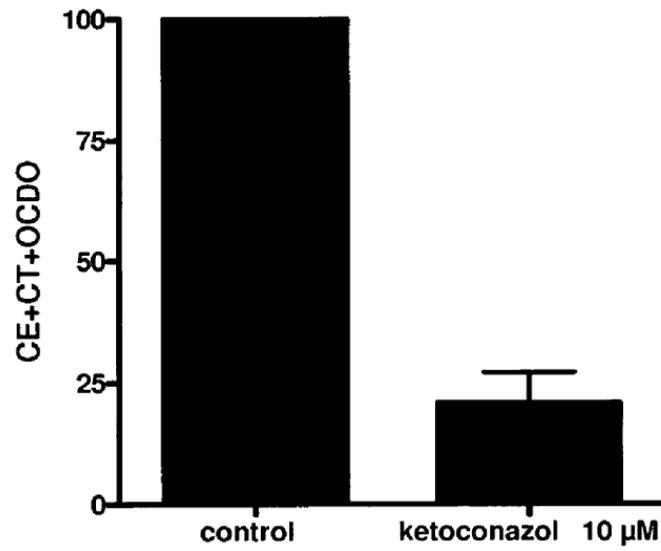


FIG. 22

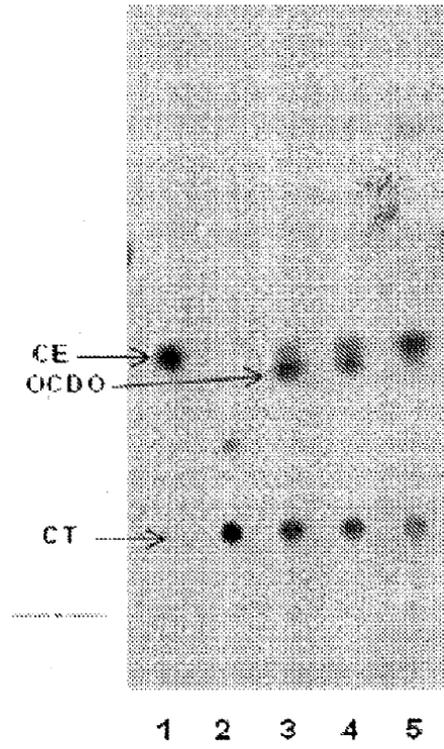


FIG. 23

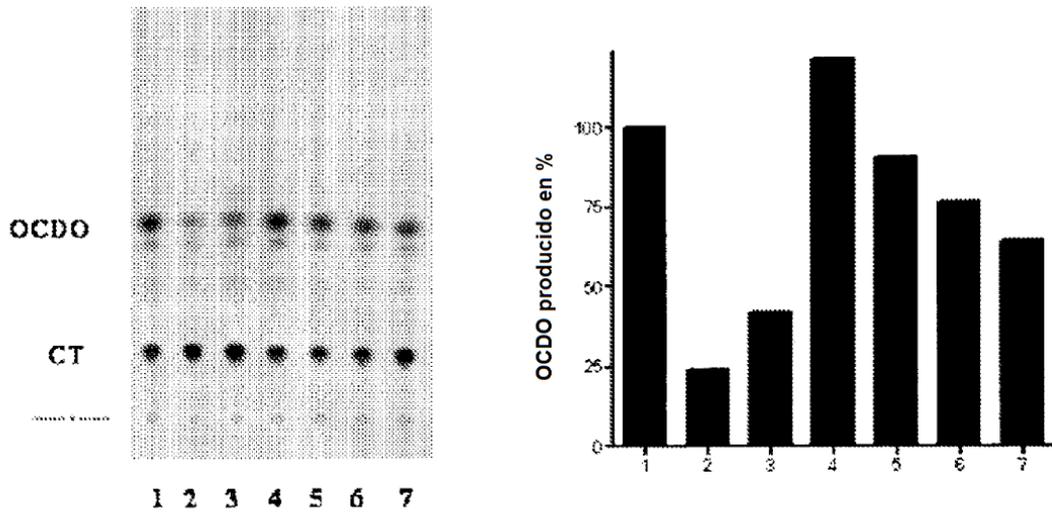


FIG. 24